



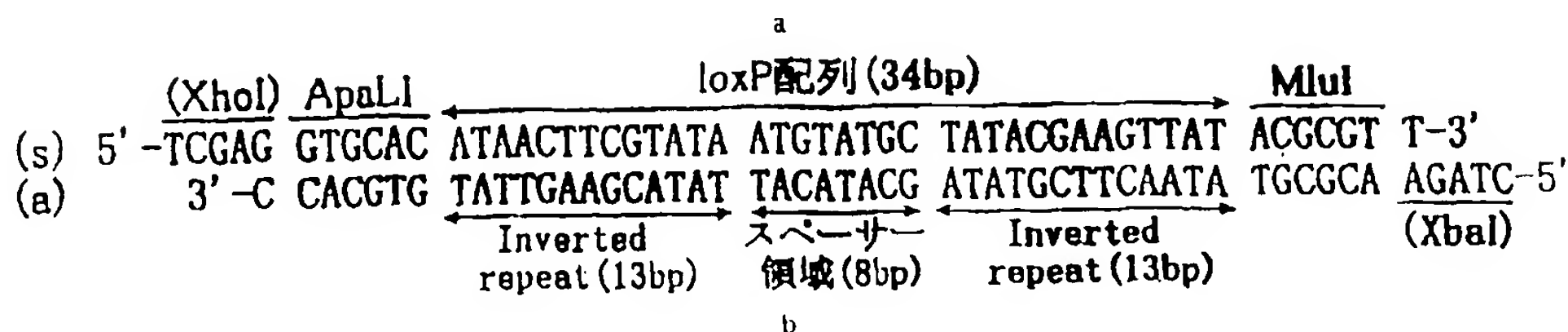
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/66, 15/79, 5/06, A61K 48/00, A01K 67/027</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/25851</p> <p>(43) 国際公開日 1999年5月27日(27.05.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/05094</p> <p>(22) 国際出願日 1998年11月12日(12.11.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/331289 1997年11月13日(13.11.97) JP 特願平10/273150 1998年9月28日(28.09.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社(SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町二丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 斎藤 卓(SAITO, Izumu)[JP/JP] 〒151-0053 東京都渋谷区代々木二丁目37番15-412号 Tokyo, (JP) 田中啓二(TANAKA, Keiji)[JP/JP] 〒607-8035 京都府京都市山科区四ノ宮神田町7 ラファイエールビル506 Kyoto, (JP)</p>	<p>(74) 代理人 弁理士 茂村 皓, 外(ASAMURA, Kiyoshi, et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロ ア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54)Title: VARIANT loxP SEQUENCES AND APPLICATION OF THE SAME

(54)発明の名称 変異型loxP配列とその応用



a ... loxP SEQUENCE (34 bps)

b ... SPACER REGION (8 bps)

(57) Abstract

Variant loxP sequences having the characteristics (a) to (c) as specified below whereby gene insertion or gene substitution can be

本発明による以下の(a)～(c)の性質をもつ変異型loxP配列を用いること
によって、動物細胞をはじめとする高等真核細胞で、効率の高い遺伝子挿入もし
くは遺伝子置換を行うことができる。

(a) 大腸菌P1ファージ由来の下記の野生型loxP配列において、中央部の8塩基
(スペーサー領域)の2番目(T)、3番目(G)、4番目(T)又は5番目
(A)の塩基のうち少なくとも一つの塩基及び6番目(T)又は7番目(G)の
塩基のうち少なくとも一方の塩基が異なる塩基に置換され、スペーサー領域以外
の領域は任意の塩基に置換されていてもよい配列からなり、

12345678

5'-ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT-3'

スペーサー領域

(b) リコンビナーゼCreの存在下でも野生型loxP配列との間で特異的DNA組
換え反応が起こらず、

(c) リコンビナーゼCreの存在下、同一の配列を有するもう一つの変異型loxP
配列との間で特異的DNA組換え反応が起こる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパブリック第 1 頁に掲載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード(参考情報)

AF	アフガニスタン	FS	フィンランド	LT	リトアニア	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	ラトビア	SK	スロバキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトビア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	IG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ギニア	MD	モルドヴァ	TI	タイ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	IM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TR	トルコ

明 細 書

変異型 loxP 配列とその応用

5 技術分野

本発明は変異型 loxP 配列とその応用に関する。さらに詳しくは、野生型 loxP 配列とは特異的組換え反応は起こさないが変異型どうしでは特異的組換え反応を起こす変異型 loxP 配列と、該変異型 loxP 配列を用いた遺伝子の置換方法に関する。

背景技術

- 10 動物ウイルスや高等真核細胞である動物細胞の染色体の特定の部位に、任意の遺伝子を挿入すること、あるいは特定の遺伝子を欠如させることは容易ではない。例えば、動物細胞の染色体の特定の部位に遺伝子を挿入する方法として一般に行われているのは、目的遺伝子を挿入したい染色体の部位と同じ配列の DNA を目的
- 15 り目的遺伝子が挿入された細胞を得る方法である。しかし、相同組換えの頻度は著しく低く、そのために目的遺伝子とともに薬剤耐性遺伝子等を同時に組み込み、薬剤による選択を行う必要があり、目的の細胞を得るまでに数ヶ月を要する。また、目的遺伝子を挿入した組換え動物ウイルスの作製は、前述の細胞染色体の場合より多少簡便であるが、それでも例えば組換えアデノウイルスを作製する場合、
- 20 目的の遺伝子を挿入したプラスミド等を用いて相同組換えを行い、その後組換えウイルスのクローン化ならびに選抜及び増殖をさせる必要がある (Bett et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 91, 8802-8806 (1994)、Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 93, 1320-1324 (1996))。

このように動物細胞の染色体の特定の部位の遺伝子操作や組換えウイルス作製の困難な原因の一つは、頻度の低い相同組換えを用いているからである。これに

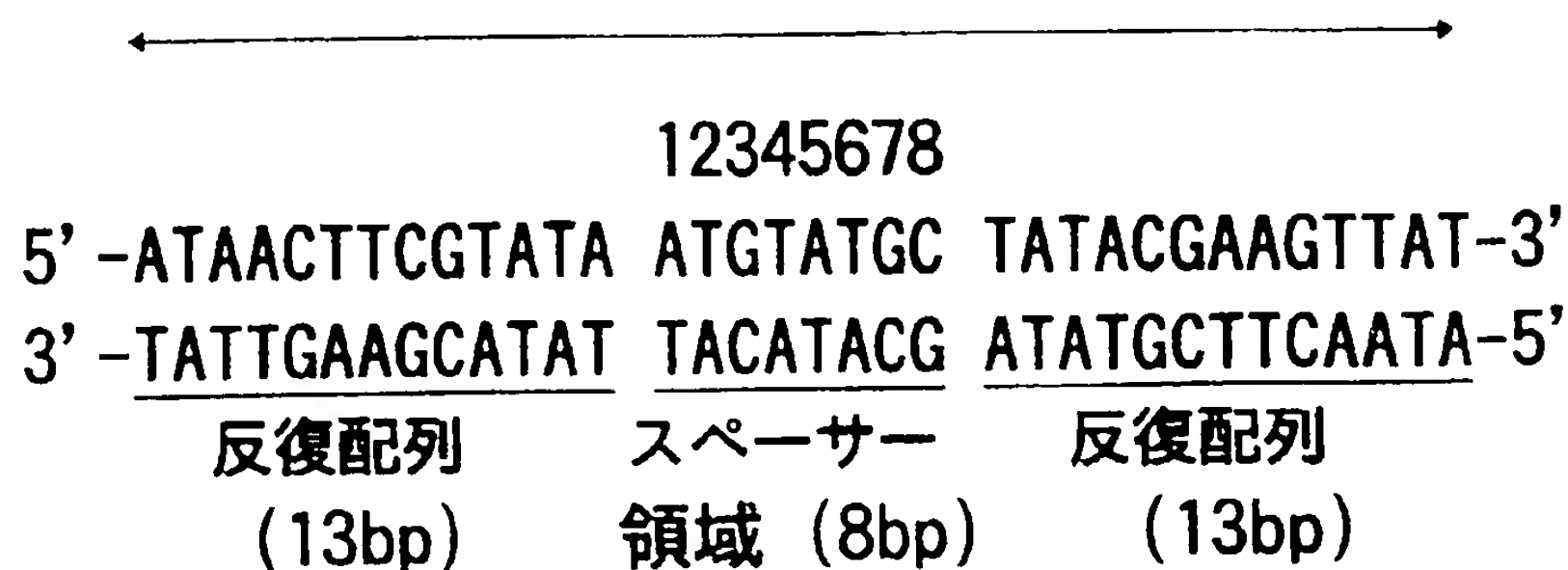
Creは、特定の塩基配列（loxP配列）を認識し、この配列間でDNA鎖の切断、鎖の交換と結合の全行程を行う特異的なDNA組換え酵素である（Sternberg et al., J. Mol. Biol., Vol. 150, 467-486(1981)、Abremski et al., J. Biol. Chem., Vol. 259, 1509-1514(1984)、Hoess et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.81, 1026-1029(1984)）。すなわち、同一DNA分子上に同方向の2つのloxP配列が存在する場合は、その間に挟まれたDNA配列が切り出されて環状分子となり（切り出し反応）、またその逆に、異なるDNA分子上に2つのloxP配列が存在し、その一方が環状DNAである場合は、loxP配列を介して環状DNAが他方のDNA分子上に挿入される（挿入反応）。Cre及びloxP配列はバクテリオファージで発見されたが、
10 特異的なDNA組換え反応は、前核細胞だけでなく真核細胞である動物細胞や動物ウイルスでも機能することが知られており、切り出し反応の例としては、動物培養細胞（Sauer et al., Nucleic Acids Res., Vol.17, 147-161(1989)、Kanegae et al., Gene, Vol.181, 207-212(1996)）、動物ウイルス（Sauer et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.85, 5166-5170(1988)、Anton et al., J. Virol., Vol.69, 4600-4606(1995)、Kanegae et al., Nucleic Acids Res., Vol.23, 3816-3821(1995)）、トランスジェニックマウス（Lakso et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.89, 6232-6236(1992)、Orban et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.89, 6861-6865(1992)、Gu et al., Cell, Vol. 73, 1155-1164(1993)、Gu et al., Science, Vol. 265, 103-106(1994)）等が挙げら
15 20 れる。

一方、挿入反応を利用すれば、loxP配列が既に存在する動物細胞の染色体やウイルスゲノムに、任意の遺伝子を挿入することが可能であるが、その頻度は極めて低く（Fukushige et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.89, 7905-7909(1992)、Sauer et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.84, 9108-9112(1987)）、実用的でない。
25 い。なぜならば、挿入反応と切り出し反応は可逆的であり、挿入反応により同一

（挿入反応と切り出し反応）は、同一の酵素（Cre）と同一の配列（loxP配列）を用いて行われる。loxP配列は34塩基

DNA配列から成り、2つの13塩基の逆方向反復配列 (inverted repeat) に挟まれた8塩基の配列はスペーサー領域と呼ばれ、DNA鎖の組換えはスペーサー領域で行われることが知られている (Hoess et al., J. Mol. Biol., Vol. 181, 351-362(1985))。

loxP 配列 (34bp)



5

このスぺーサー領域の塩基の7番目の塩基をG（グアニン）からA（アデニン）に置換したloxP配列（変異型loxP配列）は、野生型loxP配列との間では特異的DNA組換え反応が起きないが、2つの変異型loxP配列間では特異的DNA組換え反応が起きることが示された（Hoess et al., Nucleic Acids Res., Vol.14, 2287-2300(1986)）。

また、あるDNA分子の変異型loxP配列と野生型loxP配列との間に存在する遺伝子を、他のDNA分子上に存在する変異型loxP配列と野生型loxP配列との間に挿入あるいは置換する試みが行われた。その例として、プラスミドベクター上の遺伝子のバクテリオファージ上の遺伝子との置換 (Waterhouse et al., Nucleic Acids Res., Vol.21, 2265-2266(1993))、ファージミドベクター上の遺伝子のプラスミドベクターへの挿入 (Tsurushita et al., Gene, Vol.172, 59-63(1996))、プラスミドベクター上の遺伝子の動物細胞染色体上の遺伝子との置

[illegible]

loxP配列（変異型loxP配列）のみを用いて行われており、該配列の変異型loxP配列が野生型loxP配列との間で組換え反応を起こさないために好適であるかどうか明らかではない。さらに、上記3件の試みは、全て薬剤耐性遺伝子そのものか、あるいは目的遺伝子とともに薬剤耐性遺伝子を挿入し、目的の組換えが生じたDNA分子を有する組換え体のみが薬剤耐性を獲得し増幅されるという実験系が用いられているので、loxP配列の変異が不十分で野生型loxP配列と反応が起き、実際の遺伝子挿入（遺伝子置換）の効率が低下していても、薬剤選択というバイアスがかかっているため、見かけ上の反応効率は高く表示されている可能性がある。

実際、本発明者らが考案した直接的かつ定量的な測定方法では、7番目の塩基をGからAに置換した変異型loxP配列は、約5%の頻度で野生型loxP配列との間で組換え反応が起こり、loxP配列の変異が不十分であることが確認された。

このように、従来の技術では変異型loxP配列と野生型loxP配列とを用い、動物細胞の染色体に存在する遺伝子置換を行う技術が考案されてはいるが、その効率は十分ではなかった。

15 発明の開示

本発明の目的は、リコンビナーゼ Cre の存在下、野生型loxP配列とは組換え反応が起きず、かつ同一配列の2つの変異型loxP配列間での組換え反応は2つの野生型loxP配列間と同程度の効率で起こる変異型loxP配列を提供することである。さらに本発明の目的は、野生型loxP配列と変異型loxP配列、もしくは異なる配列の変異型loxP配列の組み合わせにより、動物細胞をはじめとする高等真核細胞で、効率の高い遺伝子挿入もしくは遺伝子置換を行う方法を提供し、その方法を動植物細胞への遺伝子導入、組換えウイルス作製、動植物個体での遺伝子操作などに応用することにある。

本発明者らは、loxP配列のスペーサー領域の8塩基全てについて可能な1塩基置換の変異型loxP配列を作製し、非常に鋭敏な測定方法で反応性を試験すること

を幾つも試みた。変異型loxP配列は、野生型loxP配列と同一配列間での組換え反応は起こさず、野生型loxP配列と異なる配列の変異型loxP配列とは組換え反

応が起こらない変異型loxP配列を見出した。さらに、これらのloxP配列を組み合わせることにより、動物細胞の染色体に非常に高い効率で遺伝子を挿入することに成功した。本発明は、かかる知見に基づいて、さらに研究を進めて完成するに至ったものである。

5 すなわち、本発明の要旨は、次の(1)～(21)のとおりである；

(1) 以下の性質をもつ変異型loxP配列。

- (a) 大腸菌P1ファージ由来の下記の野生型loxP配列において、中央部の8塩基
(スパーサー領域)の2番目(T)、3番目(G)、4番目(T)又は5番目
(A)の塩基のうち少なくとも一つの塩基及び6番目(T)又は7番目(G)の
10 塩基のうち少なくとも一方の塩基が異なる塩基に置換され、スパーサー領域以外
の領域は任意の塩基に置換されていてもよい配列からなり、

12345678

5'-ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT-3'

スパーサー領域

- (b) リコンビナーゼCreの存在下でも野生型loxP配列との間で特異的DNA
15 組換え反応が起こらず、

(c) リコンビナーゼCreの存在下、同一の配列を有するもう一つの変異型
loxP配列との間で特異的DNA組換え反応が起こる；

(2) 以下の性質をもつ変異型loxP配列。

- (a) 大腸菌P1ファージ由来の下記の野生型loxP配列において、中央部の8塩基
20 (スパーサー領域)の2番目(T)、3番目(G)及び4番目(T)の塩基から
選ばれる一つの塩基が異なる塩基に置換され、スパーサー領域以外の領域は任意

12345678
 5'-ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT-3'
 スペーサー領域

- (b) リコンビナーゼ Cre の存在下でも野生型 loxP 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こらず、
- 5 (c) リコンビナーゼ Cre の存在下、同一の配列を有するもう一つの変異型 loxP 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こる；
- (3) リコンビナーゼ Cre の存在下でも異なる配列を有するもう一つの変異型 loxP 配列との間で特異的 DNA 組換え反応が起こらない、上記 (1) 又は (2) 記載の変異型 loxP 配列；
- 10 (4) 配列番号：26、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：35、配列番号：39、配列番号：42 又は配列番号 49 で表される配列である上記 (1) 記載の変異型 loxP 配列、
- (5) 上記 (1) ないし (4) いずれかに記載の変異型 loxP 配列を有する DNA；
- 15 (6) 少なくとも一つの野生型 loxP 配列及び上記 (1) 又は (2) 記載の変異型 loxP 配列を少なくとも一つ有する DNA；
- (7) 野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列の間に所望の遺伝子が挿入された上記 (6) 記載の DNA；
- (8) 互いに異なる配列をもつ少なくとも 2 つの上記 (3) 記載の変異型 loxP 配列を有する DNA；
- 20 (9) 互いに異なる配列をもつ 2 つの変異型 loxP 配列の間に所望の遺伝子が挿入された DNA；
- 25 (10) 上記 DNA (4) 及び DNA (5) をリコンビナーゼ Cre の存在下で

に反応させ、下記のDNA (c) を得ることからなる遺伝子置換方法。

(a) 野生型loxP配列、遺伝子A及び上記(1)又は(2)記載の変異型loxP配列をこの順に有するDNA。

(b) 野生型loxP配列、遺伝子B及びDNA (a) と同じ変異型loxP配列をこの
5 順に有する環状DNA。

(c) DNA (a) において遺伝子Aが遺伝子Bに置換されたDNA。

ここで、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である；

(12) 下記のDNA (a) 及びDNA (b) をリコンビナーゼCreの存在下
に反応させ、下記のDNA (c) を得ることからなる遺伝子置換方法。

10 (a) 互いに異なる配列をもつ2つの上記(3)記載の変異型loxP配列(変異型
loxP配列1及び変異型loxP配列2)及び遺伝子Aを変異型loxP配列1/遺伝子A
/変異型loxP配列2の順に有するDNA。

(b) 変異型loxP配列1、遺伝子B及び変異型loxP配列2をこの順に有する環状
DNA。

15 (c) DNA (a) において遺伝子Aが遺伝子Bに置換されたDNA。

ここで、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である；

(13) 遺伝子Bが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする上記(11)又は
(12)記載の方法；

(14) 遺伝子Aが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする上記(11)又は

20 (12)記載の方法；

(15) DNA (a) が細胞の染色体DNAであり、DNA (b) がプラスミド
DNA又は二本鎖環状DNAウイルスであることを特徴とする上記(11)ない
し(14)いずれかに記載の方法；

(16) DNA (a) が細胞の染色体DNAであり、DNA (b) が細胞内で変
25 換されることにより二本鎖環状DNAとなる性質を有することを特徴とする上記

(13)から(15)のDNA (a)は二本鎖環状DNA又はウイルスであることを特徴

とする上記(11)ないし(12)いずれかに記載の方法；

(18) DNA (a) が二本鎖DNAウイルスの染色体DNAであり、DNA (b) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状DNAとなる性質を有することを特徴とする上記(11)ないし(14)いずれかに記載の方法；

(19) DNA (a) の二本鎖DNAウイルスがアデノウイルスであることを特徴とする上記(17)又は(18)記載の方法；

(20) 上記(6)ないし(9)いずれかに記載のDNAを染色体上に有するトランスジェニック動物；

(21) 上記(6)ないし(9)いずれかに記載のDNAからなる医薬。

図面の簡単な説明

10 図1は、野生型loxP配列の合成DNAの構造を示す図である。(s)はセンス鎖を、(a)はアンチセンス鎖を示す。

図2は、合成された1塩基置換の変異型loxP配列のスペーサー領域の配列(センス鎖)を示す。

図3は、合成された1塩基置換の変異型loxP配列のスペーサー領域の配列(アンチセンス鎖)を示す。

図4は、合成された2塩基置換の変異型loxP配列のスペーサー領域の配列(センス鎖)を示す。

図5は、合成された2塩基置換の変異型loxP配列のスペーサー領域の配列(アンチセンス鎖)を示す。

20 図6は、直鎖状DNAを基質とした場合の、変異型loxP配列間でのリコンビナーゼ(re依存組換え反応)を示す模式図である。「M」は変異型loxP配列を意味し、文字上の矢印はloxP配列の向きを示す。数字はBsaII消化した場合の断片の長さ(bp)を示す。

図7は、プラスミドpBRwtの構造を示す模式図である。「L」は野生型loxP配列を意味し、文字上の矢印はloxP配列の向きを示す。ApRはアンピシリン耐性

図8は、直鎖状DNAを示す模式図である。「M」は変異型loxP配列を意味し、文字上の矢印はloxP配列の向きを示す。以下の図で利用

様である)。また、下向きの矢印はB s a H Iサイトを示し、数字はB s a H I消化断片の長さ (b p) を示す。

図9は、プラスミドpBLAmutantの構造を示す模式図である。太線部分はpBR322由来であり、細線部分はアデノウイルス由来である。

- 5 図10は、直鎖状DNAを基質とした場合の、野生型loxP配列と変異型loxP配列間でのリコンビナーゼCre依存組換え反応を示す模式図である。細い矢印はD r a Iサイトを示す。

図11は、プラスミドpULwL (A)、プラスミドpULwM (B) 及びプラスミドpUMwL (C) の構造を示す模式図である。

- 10 図12は、プラスミドpULwMの構築に用いた変異型合成DNAの配列を示す図である。中央の下線部がloxP配列(34bp)、二重下線部がスペーサー領域(8bp)であり、変異を導入した塩基は太字で表示してある。

- 図13は、プラスミドpUMwLの構築に用いた変異型合成DNAの配列を示す図である。中央の下線部がloxP配列(34bp)、二重下線部がスペーサー領域(8bp)であり、変異を導入した塩基は太字で表示してある。
- 15

図14は、プラスミドpCALwL (D) 及びプラスミドpCALwM (E) の構造を示す模式図である。C A P r oはC A Gプロモーター、G p Aは β -グロビンポリA配列を示す。

- 図15は、プラスミドpULZM (F) 及びプラスミドpUMOL (G) の構造を示す模式図である。S p AはS V 40のo r i及びポリA配列を示す。
- 20

図16は、プラスミドpULZMOL (H) 及びプラスミドpUALZMOL (I) の構造を示す模式図である。T p AはチミジンキナーゼのポリA配列を示す。

- 図17は、野生型loxP配列と変異型loxP配列との組み合わせにより、プラスミドDNA (環状DNA) 上に存在するlacZ遺伝子をアデノウイルスゲノム上に挿入できることを示すための実験の模式図である。
- 25

この遺伝子は、(a) 野生型loxP配列と変異型loxP配列とを有するプラスミドDNA上に存在する。

図19は、アデノウイルスゲノム上の遺伝子の置換実験の結果を示す図である。Cre発現組換えアデノウイルスをmoi=15でターゲット用組換えアデノウイルスをmoi=9でCV-1細胞に感染させた。ドナー用組換えアデノウイルスのmoi=60では約60%、moi=100では約90%の細胞が青く染色された。

- 5 図20は、野生型loxP配列と変異型loxP配列との組み合わせにより、プラスミドDNA（環状DNA）上に存在するlacZ遺伝子を細胞の染色体上の遺伝子に挿入できることを示すための実験の模式図である。

- 図21は、細胞の染色体上の遺伝子の置換実験の結果を示す図である。ハイグロマイシンB耐性の任意の6株のターゲット細胞（C3、C7、C8、C11、C19、
10 C28）に、それぞれCre発現組換えアデノウイルスAxCANCreをmoi=5で、ドナー用組換えアデノウイルスAxALZMOLをmoi=10、30、100、300で同時に1時間感染させた。細胞株により頻度は異なるが、ドナー用組換えアデノウイルスをmoi=100で感染した場合、10%（C19）から30%（C8）の細胞が青く染色された。

発明を実施するための最良の形態

- 15 以下に本発明について詳細に説明する。

- 本発明における変異型loxP配列とは、野生型loxP配列のスペーサー領域の特定の塩基を本来とは異なる塩基に置換し、その置換によりリコンビナーゼCreによる特異的DNA組換え反応における基質特異性が変化する配列を指し、基質特異性に影響しない他の塩基の置換を含んでいてもよい。ここにいう基質特異性とは、
20 例えば、野生型loxP配列、変異型loxP配列1、変異型loxP配列2の3種類のloxP配列が存在する場合、野生型loxP配列と変異型loxP配列1、野生型loxP配列と変異型loxP配列2、変異型loxP配列1と変異型loxP配列2のそれぞれの組合せでは、Creによる特異的DNA組換え反応が実質的に起こらないことをいう。本基質特異性の程度は、後述する遺伝子置換方法を実施する上で十分であればよい。

- 25 この変異型loxP配列と野生型loxP配列とをあらかじめ細胞の染色体に組み込ん

配列は、野生型loxP配列、変異型loxP配列1、変異型loxP配列2の3種類のloxP配列を任意の組み合わせで細胞の染色体に組み込む。挿入反応とは異なる組み合わせのloxP配列

列間（挿入反応が野生型loxP配列間であれば変異型loxP配列間）で切り出し反応が起こることにより、環状DNAの変異型loxP配列と野生型loxP配列との間の任意の遺伝子が、細胞の染色体の変異型loxP配列と野生型loxP配列との間に挿入される。また、細胞の染色体の変異型loxP配列と野生型loxP配列との間に別の遺伝子が存在する場合は、上記反応によりこの遺伝子は染色体から除かれ、環状DNAに挿入されている遺伝子に置換される。従って、細胞の染色体に変異型loxP配列と野生型loxP配列が存在すれば、その部位に任意の遺伝子を効率よく導入することが可能となる。また、変異型loxP配列と野生型loxP配列との組み合わせの代わりに、特異的DNA組換え反応が起こらない2つの変異型loxP配列を用いることもできる。

本発明の変異型loxP配列は以下のようにして見出された。

loxP配列の基質特異性が変化した変異型loxP配列としては、スパーサー領域の塩基の7番目の塩基をGからAに置換した配列が知られている（Hoess et al., Nucleic Acids Res., Vol.14, 2287-2300(1986)）。そのアッセイ法では、アンピシリン耐性遺伝子及びカナマイシン耐性遺伝子を有するプラスミドのカナマイシン耐性遺伝子の両側に野生型loxP配列と変異型loxP配列とを挿入し、得られたプラスミドでCre発現大腸菌を形質転換した。そして、アンピシリン耐性を獲得した大腸菌を選別後、カナマイシン耐性の有無（2つのloxP配列間で組換えが起きますとカナマイシン耐性を失う）で、野生型loxP配列と変異型loxP配列との間の組換え反応の程度を判断している。すなわち、1分子のプラスミドでのCreによる組換え反応の結果を何億倍にも増幅し、しかも薬剤による選択を行っているため、実際の組換え反応をどの程度反映しているかは明らかではない。

そこで本発明者らは、より直接的で定量的なアッセイ方法確立し、Creによる組換え反応に必須のloxP配列内の塩基を同定した。まずそのアッセイ法を簡単に説明する。8塩基のスパーサー領域の全ての塩基を1塩基ずつ、可能な全ての塩

基消去し、直鎖状にしたDNA断片を両端に野生型loxP配列及び変異型loxP配列を結合させたDNA断片を基質として用いた。この基質DNAをin vitroの無細胞系で

Cre蛋白と反応させ組換え反応を行い、適当な制限酵素で消化後電気泳動することにより、変異型loxP配列の野生型loxP配列との組換え反応の効率を定量的に測定した。その結果、以下に示す結果が得られた；

- 5 反応する；
- (1) スペーサー領域の1番目又は8番目の塩基を置換しても、野生型loxP配列と
- (2) 2番目、3番目、4番目又は5番目の塩基を置換すると、反応は大部分中間体で止まり、最終段階まではほとんど進まない。その程度は置換箇所により若干差があり、5番目の置換ではごく一部最終段階まで進む；
- 10 (3) 6番目の塩基を置換すると、中間体はほとんどできないが、反応は一部最終段階まで進む。反応が最終段階まで進む割合は、5番目または7番目の塩基を置換した場合よりも多い。また置換する塩基の種類により反応の進行度は異なり、本来の塩基であるTをAに置換すると、CまたはGに置換した場合より、反応が最終段階まで進む割合が高い；
- 15 (4) 7番目の塩基を置換すると、中間体はほとんどできないが、反応はごく一部最終段階まで進む。従来報告されているのは、この7番目の塩基のGからAへの置換であるが、この置換を行っても、反応は約5%の頻度で最終段階まで進行した。この頻度は、本発明の目的である遺伝子置換を行うのには高すぎる値である。なぜならば、野生型loxP配列と変異型loxP配列との間で5%もの頻度で組換え反応が起きると、Creによる切り出し反応により、2つのloxP配列（野生型及び変異
- 20 型）の間に存在する遺伝子が欠失してしまう可能性があるからである。

なお、ここでいう中間体とは、二本鎖DNAのうち片側の鎖は組換わっているが他方は組換わっていない、いわゆるホリデー構造（Holliday structure, Hoess et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 84, 6840-6844 (1987)）の状態を意味する。

- 2つのloxP配列間での組換え反応は、まずスペーサー領域の下側の鎖の7番目と
- 25 8番目の塩基の間が切断され再結合した後、上側の鎖の1番目と2番目の塩基の

置換（1番目と2番目の塩基の置換）は質的に異なり、前者は上側の鎖の組換えを引き起こし、上側の鎖の組換えを引き起こす、中間体で反応が止まったもの、後者は

下側の鎖の組換えの頻度は低いものが、その一部で組換え反応が起き、反応が最終段階まで進行したものであることが明らかになった。

次に、同様のアッセイ方法で、同じ配列の2つの変異型loxP配列間での組換え反応を検討した。置換箇所及び置換した塩基の種類により反応性に差はあるものの、2番目から7番目の塩基のうち1塩基を置換した2つの変異型loxP配列間で、Creによる特異的な組換え反応が認められた。その反応の程度の差は、置換箇所よりも、置換した塩基の種類に依存していた。例えば、3番目の塩基(G)のCへの置換、及び7番目の塩基(G)のTへの置換は、他の2種類の塩基に置換した場合よりも明らかに反応性は悪かった。

従って、野生型loxP配列において、中央部の8塩基（スペーサー領域）の2番目（T）、3番目（G）及び4番目（T）の塩基から選ばれる一つの塩基が異なる塩基に置換された配列の変異型loxP配列及び該変異型loxP配列を有するDNAは本発明に含まれる。

また、以上の知見より、質的に異なる塩基の置換箇所、すなわち2番目から5番目の任意の箇所と6番目または7番目を、2つ以上組み合わせることにより、1塩基のみの置換とは異なり、極めて高い特異性を有し、同じ変異型loxP配列どうしでは1塩基置換に匹敵する組換え効率をもつ変異型loxP配列が得られることが予想された。

そこで、次に2番目から5番目の任意の一塩基の置換と7番目の塩基の置換とを組み合わせた変異型loxP配列について、野生型loxP配列との組換え反応効率及び同じ配列の2つの変異型loxP配列間での組換え反応の効率を検討した。2塩基置換した変異型loxP配列のほとんどは、野生型loxP配列との組合せでは組換え反応は最終段階まで全く進まず、1塩基のみの置換よりも基質特異性が明らかに上昇した。しかしながら、同じ配列の2つの変異型loxP配列間での組換え反応の効率は、配列により大きく異なり、全く反応しない配列もあったが、次に示す変

15A-17A(=317)、配列番号17、15G-17G(=517)、配列番号17
 14C-17A(=417)、配列番号14、15G-17A(=517)、配列番号14

T2A/G7C(#2272)及びA5G/G7A(#5171)の反応効率は非常に高かった。なお、数字は置換する塩基の場所、数字の前の塩基は置換前の塩基、数字の後の塩基は置換後の塩基を示す。例えば、T2C/G7Aは、2番目の塩基をTからCへ、7番目の塩基をGからAへ置換した配列を示す。また、かっこ内の番号及び配列番号との関係は後

5 記の表2に示されている。

このように、野生型loxP配列のスペーサー領域の2つの塩基を同時に置換した変異型loxP配列は、野生型loxP配列とは組換え反応を起こさず、2つの変異型loxP配列どうしでは高い効率で組換え反応が起きたことより、1塩基のみ置換したloxP配列よりもさらに基質特異性が増加したことが明らかとなった。

10 従って、野生型loxP配列において、中央部の8塩基（スペーサー領域）の2番目（T）、3番目（G）、4番目（T）又は5番目（A）の塩基のうち少なくとも一つの塩基及び6番目（T）又は7番目（G）の塩基のうち少なくとも一方の塩基が異なる塩基に置換された変異型loxP配列及び該変異型loxP配列を有するDNAは、本発明に含まれる。

15 さらに本発明者らは、異なる配列の変異型loxP配列の間で組換え反応が起こるかどうかを検討した。その例としてT2C/G7A(#2171)とT2A/G7C(#2272)を挙げるが、これら2種の変異型loxP配列間では組換え反応は全く起こらなかった。このことは、野生型loxP配列、変異型loxP配列1、変異型loxP配列2の、少なくとも3種類の基質特異性が異なるloxP配列を見出したことを意味し、後述する遺伝子置換を
20 行う上で有用である。

次に、本発明の変異型loxP配列を用いた遺伝子置換の方法及びその応用について説明する。

本発明の遺伝子置換方法は、野生型loxP配列、遺伝子A及び変異型loxP配列をこの順に有するDNA（a）と、野生型loxP配列、変異型loxP配列をこの順に有
25 する環状DNA（b）とをリコニヒターゼCreの存在下に反応させ、DNA

30 は元々異なる位置に遺伝子Aを有する。

本発明の遺伝子置換方法は、異なる配列を有する2つの変異型loxP配

列（変異型loxP配列1及び変異型loxP配列2）及び遺伝子Aを変異型loxP配列1
／遺伝子A／変異型loxP配列2の順に有するDNA（a）と、変異型loxP配列1、
遺伝子B及び変異型loxP配列2をこの順に有する環状DNA（b）とをリコンビ
ナーゼCreの存在下に反応させ、DNA（a）中の遺伝子Aを遺伝子Bに置換
5 することからなる。ここで、変異型loxP配列1と変異型loxP配列2とはCre依
存組換え反応は起こらず、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子で
ある。

遺伝子置換の方法は、基本的に次のようにして行う。その例として、野生型
loxP配列と変異型loxP配列を用いた方法につき説明するが、変異型loxP配列1と
10 変異型loxP配列2を用いる場合も同様である。また、動物細胞の染色体の遺伝子
を置換する場合を例として説明するが、本方法は動物細胞の染色体に限らず、動
物ウイルスのゲノムや、植物細胞、酵母または細菌等の微生物の染色体や、バク
テリオファージなどにも適用できる。

まず、動物細胞の染色体にあらかじめ野生型loxP配列と変異型loxP配列とを挿
15 入しておく。野生型loxP配列と変異型loxP配列との間には任意の遺伝子Aが存在
してよく、この場合は遺伝子置換となり、遺伝子Aが存在しない場合には、遺伝
子挿入となる。

一方、野生型loxP配列と変異型loxP配列とを挿入した環状DNA分子の2つの
loxP配列の間に、導入しようとする遺伝子Bを挿入しておく。この環状DNA分子
20 は、例えばプラスミドDNAや二本鎖環状DNAウイルスのようにあらかじめ環状分子
となったものを用いてもよいし、また何らかの操作により細胞内に導入後、環状
分子となるものを用いてもよい。この遺伝子Bと野生型及び変異型loxP配列が存
在する環状DNA分子を公知の方法により前述した細胞内に導入し、同時に公知の
方法によりCre蛋白を細胞内で発現させることにより、環状DNA分子上の遺伝子B
25 が細胞の染色体上の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に挿入される。その

配列の間には遺伝子Aが存在しない場合は、染色体上の遺伝子Aを除くこ
うして、変異型loxP配列の間には遺伝子Aが存在しない場合は、染色体上の遺伝子Aを除くこ

とができる。しかも、遺伝子Aを除いても染色体上には2つのloxP配列は存在するので、2つのloxP配列の間に任意の遺伝子Cを有する別の環状DNA分子を用いることにより、再びこの染色体上の2つのloxP配列間に遺伝子を導入することができる。

- 5 動物細胞に環状DNA分子を導入する方法は、一般的に用いられている方法を使用することができる。その例として、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAE-dextran法、リポフェクション法、遺伝子銃などの物理化学的方法や、環状DNAウイルス等が挙げられる。環状DNAウイルスの例としては、パピローマウイルスやSV40などが挙げられる。また、細胞内に導入後、環状分子とする方法の例としては、リコンビナーゼを用いる方法が挙げられ、そのリコンビナーゼとしては、酵母の2mlプラスミド由来のFLPやチゴサッカロマイセス・ルーイイのpSR1プラスミド由来のR、そしてCreなどが挙げられる。
- 10

- 動物細胞の染色体にあらかじめ2つのloxP配列を挿入するには、例えば、2つのloxP配列が存在するプラスミドDNA等を用いて細胞を形質転換すればよい。形質転換時の遺伝子導入方法は、前述した物理化学的方法で行うことができる。さらに、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルス、HIV等の、ウイルスケノムを細胞の染色体に挿入する性質を有するウイルスを用いてもよい。
- 15

- 動物細胞内でCreを発現させる方法は、Creの遺伝子をコードするDNAやRNAを細胞に導入後、細胞内でCre蛋白を発現させる方法や、Cre蛋白そのものを細胞内に導入する方法を用いることができる。前者の例としては、Creの遺伝子をコードするDNAやRNAを前述した物理化学的方法で細胞に導入する方法や、ウイルスベクターを用いる方法が挙げられる。ウイルスベクターとしては、アデノウイルス、ロクチニアウイルス、ヘルペスウイルス、EBウイルスなどが挙げられるが、その遺伝子導入効率の高さからアデノウイルスが好適な例として挙げられる。
- 20

- 25 本発明の変異型loxP配列を用いた動物細胞染色体上での遺伝子置換法の利点は、

通常、形質転換は、細胞組織の一部分にのみ導入されるが、本発明の方法では、

変異型loxP配列を用いた方法では、染色体上での目的遺伝子の挿入部

位はランダムであるため、挿入部位により目的遺伝子の発現量及びその染色体での安定性に大きな差があるからである。そのため、例えば目的遺伝子を安定に（長期間）、しかも高発現する形質転換細胞株を得るには、非常に多くの細胞株をスクリーニングしなければならない。しかも、一遺伝子ごとに、すなわち1回の形質転換ごとに、このスクリーニングを繰り返さなければならない。それに較べて、本発明による方法では、2つのloxP配列にはさまれたある遺伝子の発現を指標にして、その発現量が高く安定な細胞株を一旦取得すれば、任意のどの遺伝子を導入しても、遺伝子の発現が高く安定な細胞株を容易に取得することができる。しかも、その効率は極めて高いため、通常必要な薬剤選択の操作が必要なく、細胞のクローン化の操作だけで目的の細胞株を短期間に取得することができる。対象とする細胞株に特に制限はないが、トランスジェニック動物の作製に用いるES細胞などの形質転換には、特に有効である。

本発明による動物細胞染色体の遺伝子置換方法は、培養細胞だけでなく動物個体に対しても適用できる。特定の外来遺伝子を動物個体で発現させる方法として、トランスジェニック動物の技術が存在するが、目的の遺伝子を発現するトランスジェニック動物の作製には非常に時間がかかる。なぜならば、通常の方法でトランスジェニック動物を作製するには、まず目的遺伝子を発現するES細胞等を作製し、次いでこのES細胞等を仮親の腹で発生させ、生まれた子どもを目的遺伝子の発現を指標にスクリーニングし、さらに目的遺伝子を発現している動物個体をかけ合わせて初めて多数のトランスジェニック動物が得られるという、複雑な操作が必要であるからである。通常これらの操作には半年から1年を要する。本発明の方法を用いれば、一旦遺伝子導入用のトランスジェニック動物を作製すれば、個々の遺伝子に応じたトランスジェニック動物の作製は不要となる。遺伝子導入用のトランスジェニック動物とは、染色体に変異型loxP配列と野生型loxP配列とを挿入した動物で、その作製は従来のトランスジェニック動物作製と同様の方法

野生型loxP配列と変異型loxP配列とを同一の遺伝子に挿入して環状DNAを形成し、これを細胞に導入して遺伝子を置換する。このとき、導入された組織や細胞で目的

遺伝子が染色体に挿入され、その遺伝子を発現させることができる。動物個体への(a)(b)の導入は、リポソーム法やウイルスベクター、遺伝子銃など既存の方法で十分に行うことができる。本発明の方法を用いれば、異なる遺伝子を導入する場合でも、遺伝子に応じた環状DNA分子(a)を用いるだけでよく、非常に時間のかかるトランスジェニック動物の作製を行う必要がない。さらに、(a)(b)両者を局所的に導入するだけで、目的の臓器や組織にのみ目的遺伝子を挿入することもできる。

本発明は、組換えウイルスの作製にも用いることができる。ウイルスとしてDNAウイルスが挙げられ、DNAウイルスとして、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、EBウイルス、サイトメガロウイルス等のヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、カナリアポックスウイルス等のポックスウイルス、昆虫のバキュロウイルス等が挙げられる。また、ウイルスとしてRNAウイルスが挙げられ、特にレトロウイルスが好ましい。なぜなら、レトロウイルスベクターを作製する場合、力価の高いウイルス産生細胞を各遺伝子を産生するレトロウイルスベクターごとに選択しているが、本法を用いることにより、一度マーカー遺伝子を発現するウイルス高産生細胞株を樹立しておけば、この細胞株染色体上のマーカー遺伝子を目的遺伝子と置換することにより、高産生株を容易に得ることができると考えられるからである。

本発明方法による組換えウイルス作製の具体的な方法を、組換えアデノウイルス
20 スの作製を例として説明する。従来の技術での組換えアデノウイルスの作製方法
は、アデノウイルスゲノム及び目的遺伝子を挿入したプラスミドベクターやコス
ミドベクター等で、293細胞などの細胞を形質転換し、相同組換えにより生じた
組換えウイルスをクローン化後、目的のウイルスを選別し増殖させる方法であり、
これには長期間の作業が必要である。本発明による方法では、効率の低い相同組
25 換えを介さないため、短期間に目的の組換えウイルスを作製することができる。

(c) 用目的の遺伝子を挿入したベクターDNAを該細胞に導入する(ステップC)

白を発現させることにより、変異型loxP配列と野生型loxP配列との間に目的遺伝子が挿入された組換えウイルスが高頻度に得られる。この場合、遺伝子導入用のアデノウイルスは、Creによる組換えによりloxP配列にはさまれたパッケージング配列が除去されるように作製し、プラスミドDNAから目的遺伝子と同時にパッケージング配列を加えて置換することにより、目的ウイルスが選択的に得られるようにしてもよい。Cre蛋白は、プラスミドDNAの形で導入してもよいし、またあらかじめ細胞を形質転換し、Cre蛋白を常時あるいは何らかの誘導により発現するようにしておいてもよい。

以下に上記方法をより詳しく説明する。外来遺伝子Aが外来遺伝子Bに置換された組換えアデノウイルスを作製する場合について説明する。遺伝子導入用の組換えアデノウイルスの構造の例として、アデノウイルス左端逆方向反復配列 (inverted terminal repeat: ITR) / 野生型loxP配列 / パッケージング配列 / 野生型loxP配列 / 遺伝子A / 変異型loxP配列、の順にloxP配列を挿入したアデノウイルスが挙げられる。ここで、野生型loxP配列 / 遺伝子Aの断片はE 1 欠失部位に挿入される。外来遺伝子B挿入用プラスミドDNAの例としては、野生型loxP配列 / パッケージング配列 / 遺伝子B / 変異型loxP配列の構造を有するプラスミドが挙げられる。これらの遺伝子導入用のアデノウイルスと外来遺伝子B挿入用プラスミドDNAとを同時に或いは順次、Cre蛋白を発現させるようにした293細胞などの細胞に導入すると、遺伝子導入用のアデノウイルスでは2つの野生型loxP配列に挟まれたパッケージング配列が除かれるとともに、野生型loxP配列 / 遺伝子A / 変異型loxP配列の部分がプラスミド由来の野生型loxP配列 / パッケージング配列 / 遺伝子B / 変異型loxP配列に置換された組換えアデノウイルスが生成する。遺伝子置換されなかった遺伝子導入用のアデノウイルスは、反応効率が高い2つの野生型loxP配列間の通常の「切り出し反応」によりパッケージング配列が除去されているため、ウイルスDNAは複製するもののウイルス粒子 (virion) 内

にウイルスDNAが複製され、組換えウイルスが生成する。

遺伝子導入用のアデノウイルスの変異型loxP配列の挿入位置は、外来遺伝子Aのすぐ隣であってもよいし、遺伝子Aから離れたアデノウイルスゲノム内であってもよい。後者の挿入位置の例としては、L3遺伝子とE2A遺伝子との間の非翻訳領域、E3遺伝子の欠失部位、E4遺伝子の上流域と右側のITRとの間などが挙げられる。これらの位置に変異型loxP配列を挿入して遺伝子置換を行う場合、生成するアデノウイルスDNAがウイルス粒子（virion）に効率よくパッケージングされるように、目的遺伝子挿入用プラスミドの野生型loxP配列／変異型loxP配列間のDNAのサイズを調節する必要があるが、遺伝子置換された組換えアデノウイルスはウイルスの複製に必須の遺伝子を欠失しているため、遺伝子治療用ベクターとして用いる場合、現在のアデノウイルスベクターで問題となっている副作用が軽減できると考えられる。

本発明の変異型loxP配列をもつDNAは、医薬として遺伝子治療にも用いることができる。その方法を以下に説明する。

まず、ヒト細胞の染色体に変異型loxP配列と野生型loxP配列とをあらかじめ挿入する。そのために、変異型loxP配列と野生型loxP配列を有するDNAが医薬品として用いられる。該DNAは、例えば、レトロウイルスやアデノ随伴ウイルス（AAV）などのウイルスベクター中に含まれる形で投与される。なかでも、AAVを使用することが好ましい。なぜならば、レトロウイルスによる遺伝子導入は、染色体にランダムに挿入されるが、AAVでは染色体の特定の部位（第19番染色体のAAV-S1領域）に挿入される確率が高いからである。この染色体の特定部位への遺伝子導入にはAAVがコードするウイルス遺伝子（Rep）が必須であるが、現在用いられているAAVベクターではAAV遺伝子の大部分が除かれているため、染色体への特異的組み込み機構は失われている。しかし、変異型loxP配列と野生型loxP配列とを合わせてもわずか100塩基足らずであるため、AAVの全ウイルス遺伝子を保持したまま、2つのloxP配列を挿入したウイルスを作製できる。その挿入位置は

（a）ヒト細胞の染色体に2つのloxP配列を挿入し、

（b）変異型loxP配列と野生型loxP配列の間には目的遺伝子を挿入した場合

DNA分子からなる医薬と、Cre蛋白もしくはCre遺伝子をコードするDNA分子を投与することにより、染色体上に存在する2つのloxP配列の間に挟まれたAAV遺伝子が除かれ、目的遺伝子に置換される。医薬としての環状DNA分子とCre蛋白もしくはCre遺伝子をコードするDNA分子をヒト細胞に導入する方法としては、ウイルスベクターやリポソームベクターなど既存の遺伝子治療に用いられているベクターを用いる方法が挙げられる。

このようにして染色体に遺伝子が挿入されたヒト細胞では、目的遺伝子の両端に変異型loxP配列と野生型loxP配列が存在し、さらにその外側にAAVのITRが存在するのみで、AAVの構造遺伝子は全く存在しないため、AAV由来の蛋白が発現し抗原となることもなく、目的遺伝子の発現が長期間安定に持続することが期待できる。また、挿入した遺伝子が不要になった場合、野生型loxP配列と変異型loxP配列の間に遺伝子が存在しない環状DNA分子を投与することにより、挿入した遺伝子を染色体から除くことができる。さらに、その後再び染色体への遺伝子の挿入が必要になった場合、2つのloxP配列が染色体上に残っているため、前述した方法で任意の遺伝子を挿入することができる。このように、本発明の変異型loxP配列をもつDNAは、染色体への遺伝子を挿入及び除去が自由にできる遺伝子治療のための医薬として用いることができる。

本発明の変異型loxP配列をもつDNAを医薬として用いる場合、該DNAの細胞内への導入方法としては、ウイルスベクターによるもの、及びその他のものに大別される（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、及びこれらの引用文献等）。本発明の医薬においてはいずれの方法も適用することができる。

ウイルスベクターによる導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、シシズス他のRNAウイルス等に本発明の変異型loxP配列をもつDNA

ジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、遺伝子銃法等が挙げられ、リポソーム法が特に好ましい。

また、本発明の変異型loxP配列をもつDNAを実際に医薬として作用させるには、該DNAを直接体内に導入するIn Vivo 法、及びヒトからある種の細胞を採取し体外で該DNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻すEx Vivo 法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45 頁、月刊薬事、36(1)、23-48（1994）、及びこれらの引用文献等）。本発明の医薬においては治療目的の疾患、標的臓器等に応じて、適宜いずれかの方法を選択して適用することができる。

本発明の医薬において、In Vivo 法により投与する場合は治療目的の疾患、標的臓器等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、筋肉内などに投与するか、又は腎臓、肝臓、肺、脳、神経等の疾患の対象部位に直接投与することができる。

また、Ex Vivo 法による場合には、常法に準じ、ヒトの細胞（例えば、リンパ球、造血幹細胞等）を採取し、それに本発明の医薬を感作させて遺伝子導入を行った後、その細胞をヒトへ戻すことが行われる。

In Vivo 法により投与する場合は、種々の製剤形態（例えば、液剤等）をとるが、一般的には有効成分である変異型loxP配列をもつDNAを含有する注射剤等とされる。また、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。当該注射剤等は常法により調製することができ、例えば、変異型loxP配列をもつDNAを適切な溶剤（例えば、滅菌された水、緩衝液、生理食塩水等）に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができ、また変異型loxP配列をもつDNAに代え、変異型loxP配列をもつDNAを組み込んだウイルスベクターを製剤化してもよい。さらに、変異型loxP配列をもつDNAを包埋したリポソーム（又はHJ V-リポソーム）においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポソーム製剤の形態とすることができる。

本発明の医薬は、変異型loxP配列をもつDNAを含有する製剤として投与される。本発明の医薬は、変異型loxP配列をもつDNAを含有する製剤として投与される。本発明の医薬は、変異型loxP配列をもつDNAを含有する製剤として投与される。

以上は、野生型loxP配列と変異型loxP配列の組合せ、もしくは変異型loxP配列1と変異型loxP配列2の組合せの2つのloxP配列を用いた場合の遺伝子置換の方法の説明であるが、基質特異性の異なる3つ以上のloxP配列を用いることにより、遺伝子置換方法の応用範囲をさらに広げることが可能である。基質特異性の異なる3つのloxP配列の組み合わせとして、例えば、野生型loxP配列と2つの変異型loxP配列、3つの変異型loxP配列等が挙げられる。本方法を、野生型loxP配列、変異型loxP配列1、変異型loxP配列2の3つの異なるloxP配列が同一DNA上に存在する場合を例として説明する。野生型loxP配列／遺伝子A／変異型loxP配列1／遺伝子B／変異型loxP配列2をこの順に有するDNA(a)に、野生型loxP配列／遺伝子C／変異型loxP配列1を有する環状DNA(b)とをリコンビナーゼCreの存在下に反応させると、DNA(a)中の遺伝子Aを遺伝子Cに置換することができる。一方、環状DNA(b)の代わりに、変異型loxP配列1／遺伝子D／変異型loxP配列2を有する環状DNA(c)とをリコンビナーゼCreの存在下に反応させると、DNA(a)中の遺伝子Bを遺伝子Dに置換することができる。すなわち、異なる環状DNAを用いるだけで、DNA(a)に存在する複数の遺伝子のうち目的の遺伝子のみを任意の遺伝子に置換することができる。

次に本発明の変異型loxP配列を用いた遺伝子置換の具体例について説明する。

以下の例で、変異型loxP配列は、全てスパーサー領域の2番目の塩基をTからCへ7番目の塩基をGからAへの置換した配列（配列番号：26）を用いた。

20 (1) アデノウイルスゲノムに存在する遺伝子の置換

置換する遺伝子の例として大腸菌lacZ遺伝子を用い、環状DNA分子上のlacZ遺伝子を、アデノウイルスゲノムの野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に挿入する系で本発明の変異型loxP配列の有効性を確認した。

まず、遺伝子置換される側のアデノウイルス、すなわちターゲット用アデノウイルスとして、E1遺伝子及びE3遺伝子を欠失させたアデノウイルス5型のE1遺伝子

[illegible]

示されているものである。

lacZ遺伝子を野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に挿入した環状DNA分子は、野生型loxP配列／lacZ遺伝子／変異型loxP配列の構造を有するプラスミドDNAとしてtransfectionにより直接細胞に導入してもよい。しかし、transfectionによる細胞への遺伝子導入効率は数10%にととまり、全ての細胞には目的DNAを導入できないため、アデノウイルスベクターを用いてCre依存的に細胞内で環状DNA分子とする方法により、ほぼすべての細胞に環状DNA分子を導入した。そのために、E1遺伝子及びE3遺伝子を欠失させたアデノウイルス5型のE1遺伝子欠失部位に、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（TK）遺伝子のポリA配列／野生型loxP配列／lacZ遺伝子／変異型loxP配列／SV40のori及びポリA配列／野生型loxP配列を、その転写方向が左向きになるように挿入した組換えアデノウイルス（AxALZMOL）を作製した。この組換えウイルスAxALZMOLをドナー用アデノウイルスと呼ぶ。AxALZMOLにCre蛋白を作用させると、2つの野生型loxP配列間で組換え反応が起こり、野生型loxP配列／lacZ遺伝子／変異型loxP配列／SV40のori及びポリA配列の構造の、環状DNA分子が生成する。なお、TK遺伝子のポリA配列は、未同定のアデノウイルス由来のプロモーターからlacZ遺伝子の転写が起こらないようにするために挿入した。また、Cre蛋白は、Cre発現組換えアデノウイルスAxCANCRe（鍾ヶ江ら、Nucleic Acids Res., Vol.23, 3816-3821(1995)）により供給した。

次に、これら3種類の組換えアデノウイルスを用い、アデノウイルスゲノムに存在する遺伝子の置換（挿入）実験を行った。ドナー用アデノウイルスAxALZMOL、ターゲット用アデノウイルスAxCALwM、及びCre発現アデノウイルスAxCANCReを、動物培養細胞（CV-1細胞もしくはCOS-1細胞）に同時に感染させた。ドナー用アデノウイルスAxALZMOL及び生成した環状DNA分子はlacZ遺伝子を有するもののプロモーターが存在しないためlacZ遺伝子は発現しない。環状DNA分子上のlacZ遺

（本発明）は、遺伝子置換（挿入）実験に用いる組換えアデノウイルス、及び、その組換えアデノウイルスを用いた遺伝子置換（挿入）実験の方法に関するものである。

上記3種類のウイルス単独、もしくはそのうちの2つのウイルスの組合せではlacZ遺伝子が発現した細胞は全く存在しなかったが、3種類のウイルスを同時に感染することによりlacZ遺伝子の発現が明らかに認められ、しかもlacZ遺伝子を発現した細胞の割合はドナー用アデノウイルスの量に依存して増加し、最大約90%の細胞でlacZ遺伝子の発現を認めた。以上の結果より、ドナー用アデノウイルス上のlacZ遺伝子が、環状DNA分子の形を介して、ターゲット用アデノウイルスの野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に非常に効率よく挿入された、すなわち遺伝子置換が起きたことが明らかとなった。

(2) 動物細胞の染色体に存在する遺伝子の置換

次に、アデノウイルスゲノム上だけでなく、動物細胞の染色体に存在する遺伝子も効率よく置換できることを示すため、以下の実験を行った。実験系の原理は（１）と同じであるが、遺伝子置換される細胞株（ターゲット細胞）を得るため、CAGプロモーター／野生型loxP配列／ハイグロマイシンB耐性遺伝子／変異型loxP配列／ポリA配列の構造のDNAを含むプラスミドで、CV-1細胞を形質転換し、ハイグロマイシンB耐性を有しかつ上記の構造のDNAが細胞当たり1コピーのみ挿入された細胞株を複数作製した。

これら細胞株にドナー用アデノウイルスAxALZM0L及びCre発現アデノウイルスAxCANCreを同時に感染させた。その結果、ドナー用アデノウイルスまたはCre発現アデノウイルス単独ではlacZ遺伝子を発現した細胞は全く存在しなかったが、
20 両ウイルスを同時感染することにより、lacZ遺伝子が発現した細胞が非常に高頻度で認められた。その割合は用いた細胞株により異なるが、最大約30%の細胞でlacZ遺伝子が発現していた。この実験系においては細胞のクローン化は一切行っていないため、lacZ遺伝子が発現した細胞の割合は、染色体上での遺伝子置換が起きた割合を直接示している。従って、以上の結果は、本発明の変異型loxP配列
25 を用いることにより、動物細胞の染色体での遺伝子置換を非常に効率よく行える

1. The first group of people who are not in the country are those who are in the country but are not in the country.

プラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞などを取り扱う諸操作は、特に断らない限り、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual. T. Maniatisら編、第2版(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory」に記載の方法に準じて行なった。

5 实施例 1

2つの変異型loxP配列間でのリコンビナーゼCre依存組換え反応

(1) リコンビナーゼCreを含む細胞抽出液の調製

リコンビナーゼCre依存組換え反応に用いるCreを含む細胞抽出液を得る目的で以下の操作を行った。Cre発現組換えアデノウイルスベクターAxCANCre（鐘ヶ江

10 E. Nucleic acid Res., Vol. 23, 3816-3821(1995)) 約 1×10^9 PFUを、225cm² フラスコ 1本の293細胞（ヒト胎児腎臓由来細胞株）に感染（37℃、1時間）させ、培地（5% FCS含有DMEM培地）を添加後さらに24時間培養した。培養終了後、低速遠心機で1000回転5分遠心し、培養上清を捨て細胞を集めた。細胞に保存用緩衝液（50%グリセロール／20mMトリス塩酸(pH7.5)／300mM塩化ナトリウム／1mM EDTA(pH7.5)）5mlを加え細胞を懸濁し、密閉型ソニケーターを用い200W、2分（30秒×4回）で細胞を破碎し、細胞内に存在するCre蛋白を放出させた。得られた細胞破碎液をマイクロ遠心機で15000回転10分遠心し、その上澄を冷凍保存（-80℃）した。

(2) 変異型loxP配列を含む合成DNAの作製

20 野生型loxP配列中の8塩基のスーパーサー部分を1塩基もしくは2塩基同時に、
他の塩基に置換した52塩基の合成DNAを作製した。合成したDNAの種類は、1塩基
の変異が24種類、2塩基同時の変異が29種類で、それぞれセンス鎖及びアンチセ
ンス鎖を合成した。野生型loxP配列の合成DNAの構造を図1（センス鎖は配列番
号：55、アンチセンス鎖の配列番号：56）に示す。また、変異型loxP配列
25 （センス鎖及びアンチセンス鎖）を図2～図5に示す。野生型センス鎖とアンチ

糖表型及 5-羟色胺代谢物 3-羟基-5-羟吲哚丙酮酸及 5-羟吲哚丙酮酸

れぞれ結合できる。

全ての1本鎖合成DNAは、5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸化し、それぞれの変異に対応するセンス鎖及びアンチセンス鎖をアニーリングした。以後、この2本鎖合成DNAを変異型loxP合成DNAと呼ぶ。

5 (3) 2つの変異型loxP配列を含む基質DNAの調製

直鎖状DNAの両端に同じ配列の変異型loxP配列を有する基質DNAを得る目的で、以下の操作を行った。

- 10 プラスミドpBR322を制限酵素NheI及びSalIで同時に消化し、変異型loxP合成DNA(1塩基のみの置換)24種類をそれぞれT4 DNAリガーゼでligation反応(プラスミド:合成DNAのモル比1:6)を行った後、制限酵素XbaI及びXhoIで同時に消化した。この制限酵素処理によりpBR322 DNAの両端に複数個結合した変異型loxP合成DNAが除かれ、pBR322 DNAの両端に同じ配列の変異型loxP合成DNAが一ヶ所ずつ結合した約4.1kbの直鎖状DNAが生じる。次いで、未反応及び制限酵素消化された変異型loxP合成DNAをGEANCLEAN II(フナコシ社製)により除き、両端に
- 15 変異型loxP配列が結合した直鎖状DNA(約4.1kb)を次に示す反応の基質DNAとして用いた。

(4) 2つの変異型loxP配列間でのCre依存組換え反応

以下に示すアッセイ方法で、2つの変異型loxP配列間でCre依存組換え反応が起きるかどうかを検討した。

- 20 終濃度、50mM トリス塩酸(pH7.5) 10mM MgCl₂ 1mg/ml ウシ血清アルブミン 1mM フェニルメチルスルホニルフロライド(PMSF) 5 µg/ml アプロチニンを含む緩衝液に、(3)で調製した基質DNA(1 µg)と(1)で調製したCreを含む細胞抽出液10 µlを加え(反応液量50 µl)、37°Cで30分反応した。反応終了後、反応液に45 µlのTEバッファー(pH8.0)及び5 µlのEDTA溶液(pH8.0)を加え、フェノール:クロロホルム抽出ならびにクロロホルム抽出を行い、さらにエタノール
- 25

は製法に準じて調製した。抽出液をエタノールで沈殿し、乾燥させた。

このように組換え反応を行った直鎖状基質DNA(約4.1kb)を制限酵素BclI

消化すると、2.7kb、610bp、380bp、360bpの4本のバンドが生じる。一方、基質DNAがCreにより組換え反応を起こすと、変異型loxPを1個有する約4.0kbの環状DNAと変異型loxPのみからなる約50bpの直鎖状DNAが生じるので、これらを制限酵素BsaHI消化すると、2.7kb、920bp、380bp、50bpの4本のバンドが生じる（図6
5 参照）。従って、920bpのバンドはCreによる組換え反応が起きたことを示し、610bp及び360bpのバンドはCreによる組換え反応が起きていないことを示すので、これらのバンドの量比により組み換え反応の効率が分かる。結果を表1に示す。

表 1. 野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列間の Cre 依存組換え反応

(1塩基置換)

配列 番号	合成 DNA 番号	変異型 loxP 配列— 変異型 loxP 配列		野生型 loxP 配列— 変異型 loxP 配列	
		中間体 (970bp)	最終反応体 (920bp)	中間体 (970bp)	最終反応体 (920bp)
1	wild	1	9	1	9
2	#11	4	2	3	5
3	#12	6	3	4	7
4	#13	4	3	3	7
5	#21	4	5	5	0
6	#22	4	5	7	0
7	#23	6	5	9	0
8	#31	5	7	9	0
9	#32	6	3	9	0
10	#33	6	6	9	0
11	#41	1	7	9	0
12	#42	5	6	9	0
13	#43	5	6	9	0
14	#51	1	9	7	1
15	#52	1	9	7	2
16	#53	1	8	7	1
17	#61	1	8	1	3
18	#62	1	8	1	6
19	#63	1	9	1	2
20	#71	1	7	1	1
21	#72	3	7	1	1
22	#73	3	1	1	1
23	#81	3	3	4	7
24	#82	8	5	5	9
25	#83	2	9	2	8

(表中、反応の中間体及び最終反応体の量を0～9までの10段階で表示した。数字が大きいほど生成量が多い。2つの野生型loxP配列間で反応を行った場合の最終反応体の量(DNAバンドの濃さ)を最大の「9」とし、DNAのバンドがほとんど検出できない場合(「9」の5%未満)を「0」とした。反応の中間体の詳細に

5 つについては、実施例2-(2)で説明する。)

#11、#73の変異型loxP配列は反応効率が悪かったが、その他の変異型loxP配列は配列により多少反応効率に差はあるものの同じ配列の変異型loxP配列どうしではCre依存組換え反応が生じることが確認された。

実施例2

10 野生型loxP配列と変異型loxP配列との間でのCre依存組換え反応(その1)

(1) 野生型loxP配列と変異型loxP配列を含む基質DNAの調製

[1] 野生型loxP配列を一つ有するプラスミド(pBRwt)の構築

プラスミドpBR322に一つの野生型loxP配列を挿入したプラスミド(pBRwt)を構築するため、以下の(a)及び(b)の操作を行った。

- 15 (a)pBR322を制限酵素EcoNIで消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化し、フェノール/クロロホルム抽出を行ってEcoNIならびにKlenow酵素を失活させた後、ゲル濾過により反応液をTEバッファに置換した。次いで、XhoIリンカー(5'-pCCTCGAGG-3')をligationし、制限酵素XhoI及びPstIで同時消化後、アガロース電気泳動を行い約2.9kbのバンドを切り出した。このバンドをGEANCLEAN
- 20 II(フナコシ社製)を用いて精製し、片側の端がXhoI消化断片、他方がPstI消化断片である約2.9kbのDNA断片を得た。

(b)pBR322を制限酵素NheIで消化し、野生型loxP配列を含む合成DNA(52bp)をligation後、制限酵素XhoI及びPstIで同時消化し、反応液をアガロース電気泳動した。野生型loxP配列を一つ含む約1.4kbのバンドを切り出し、GEANCLEAN II

- 25 (フナコシ社製)を用いて精製した。この約1.4kbのDNA断片も片側の端がXhoI消

[2] 野生型loxP配列と変異型loxP配列を含む基質DNAの調製

直鎖状DNAの片側の端に野生型loxP配列を、他方に変異型loxP配列を有する基質DNAを調製するため以下の操作を行った。

- 5 プラスミドpBRwtの野生型loxP配列から約30bp離れた位置にSalIサイトが存在するので、このプラスミドを制限酵素SalIで消化し直鎖状にした後、実施例1-(3)と同じ変異型loxP合成DNA(52bp、24種類)をligationした(プラスミド:合成DNAのモル比1:6)。この操作によりpBRwtのSalI消化部位に変異型loxP合成DNAのXhoI消化断片側が結合する。次いで、反応液を制限酵素XbaI及びXhoIで同時に消化し、pBRwtの両端に複数個結合した変異型loxP合成DNAを除いた
- 10 後、未反応及び制限酵素消化された変異型loxP合成DNAをGEANCLEAN II(フナコシ社製)により反応液から除き、片方の端に野生型loxP配列が、他方の端に変異型loxP配列が各一々結合した直鎖状DNA(約4.4kb、図8)を得た。このDNAを基質DNAとして次に示す反応に用いた。

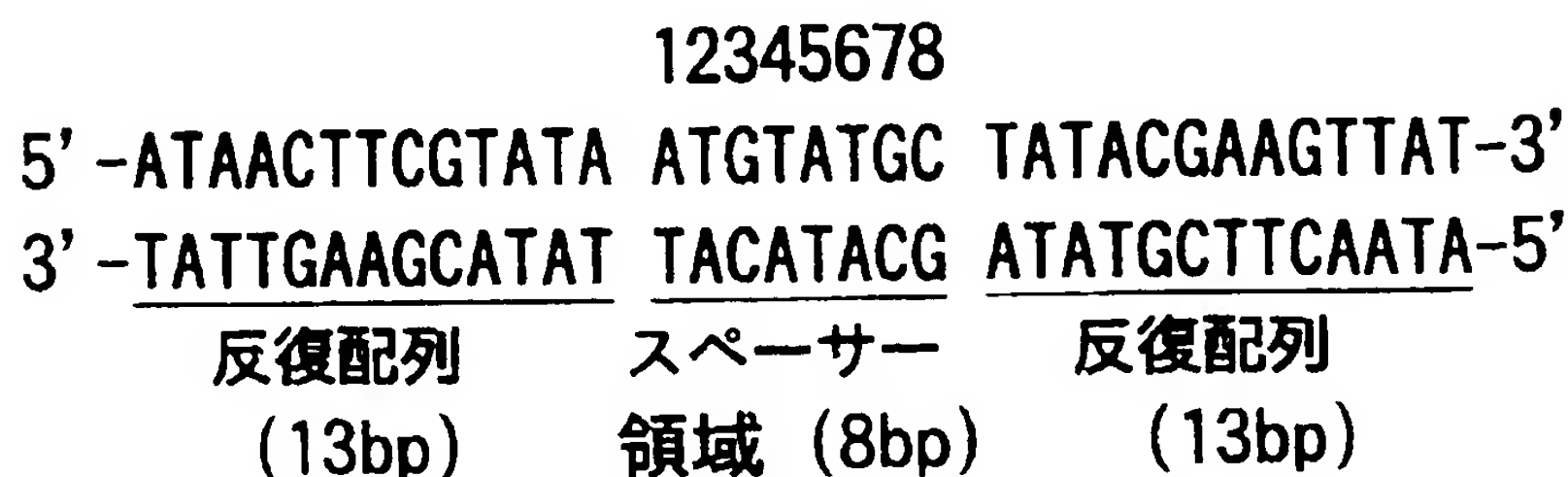
(2) 野生型loxP配列と変異型loxP配列との間でのCre依存組換え反応

- 15 反応及び解析方法は実施例1-(4)と同様であるが、基質DNAは実施例1-(3)で示したDNAの代わりに実施例2-(1)で示したDNAを用いた。

下記に示した野生型loxP配列の塩基配列で、2つのloxP配列間での組換えは、8塩基のスペーサー領域の下側のDNA鎖の7番目と8番目の塩基の間の切断・再結合がまず起こり、次いで上側のDNA鎖の1番目と2番目の塩基の間の切断・再結合が起こることで反応が完了することが知られている(Guo et al., Nature, Vol. 389, 40-46(1997))

20

loxP 配列 (34bp)



従って、下側のDNA鎖の組換えは起こるが上側のDNA鎖の組換えが起こらない場合は、反応の中間体として検出される。本発明者らが用いたアッセイ系では、この中間体は約970bp付近のバンドとして検出された。

- 5 実施例 1 -- (4) で示したが、920bpのバンドは上側及び下側のDNAの両方が組
換わり反応が完了したことに由来するバンドで、970bpのバンドは中間体で反応
が止まっていることに由来するバンドである。この2本のバンドの有無に特に着
目して解析した結果を表1に示す。また、表1の結果の概要を以下に示す（#の
後の数字は変異loxP配列番号）。
- 10 #11, 12, 13(配列番号:2, 3, 4)：反応は最終段階まで進む；
#21, 22, 23(配列番号:5, 6, 7)：反応は中間体で止まり、最終段階まで進まない；
#31, 32, 33(配列番号:8, 9, 10)：反応は中間体で止まり、最終段階まで進まない；
#41, 42, 43(配列番号:11, 12, 13)：反応は中間体で止まり、最終段階まで進まな
い；
- 15 #51, 52, 53(配列番号:14, 15, 16)：反応は大部分中間体で止まるが、ごく一部最終
段階まで進む（約5%）；
#61, 63(配列番号:17, 19)：中間体はほとんどできないが、反応はごく一部最終段
階まで進む（約5%）；
- 20 #71, 72, 73(配列番号:20, 21, 22)：中間体はほとんどできないが、反応はごく一
部最終段階まで進む（約5%）；

最終段階まで進む（約5%、最終反応体は#61, 63より少ない）。

#81, 82, 83(配列番号:23, 24, 25)：反応は最終段階まで進む；

以上の結果、1番目から8番目の塩基の置換効果を置換箇所毎にまとめると、

- (1) 1番目又は8番目の塩基を置換しても野生型loxP配列と反応する、(2) 2番目、
5 3番目又は4番目の塩基を置換すると野生型loxP配列とはほとんど反応しない、
(3) 5番目、6番目又は7番目の塩基を置換すると野生型loxP配列と反応しにく
くなるが一部反応する、ことが明らかになった。また、これらの結果から、2番
目から5番目の塩基の置換と、6番目及び7番目の塩基の置換とは質的に異なり、
前者は反応が中間体で止まり、後者は反応の最初のステップが著しく阻害されて
10 いるためであることが明らかになった。

- さらに本発明者らの測定法では、野生型loxP配列との間では特異的DNA組換え
反応が起きないと報告(Hoess et al., Nucleic Acids Res., Vol.14, 2287-
2300(1986))されている変異型loxP配列(#71に相当)は、野生型loxP配列との
反応性が完全には失われてはおらず、約5%の頻度で組換え反応が起こることが
15 明らかとなった。

実施例3

野生型loxP配列と変異型loxP配列との間でのCre依存組換え反応(その2)

(1) 野生型loxP配列と変異型loxP配列とを含む基質DNAの調製

- 野生型loxP配列と変異型loxP配列とのCre依存組換え反応を、実施例1及び2
20 で用いたアッセイ系より感度の高いアッセイ系で検出するための基質DNAを得る
ために、以下の操作を行った。

(1) 野生型loxP配列と変異型loxP配列を有するプラスミド(pBLAmutant)の構築

- pBR322の両端に野生型loxP配列と変異型loxP配列とが各一ヶ結合した約4.4kb
25 の直鎖状DNAに、アデノウイルス5型由来のDNA断片を結合したプラスミドを構築

1. 野生型loxP配列と変異型loxP配列を有するプラスミド(pBLAmutant)の調製

野生型loxP配列と変異型loxP配列とのCre依存組換え反応を、実施例1及び2
で用いたアッセイ系より感度の高いアッセイ系で検出するための基質DNAを得る
ために、以下の操作を行った。

II (フナコシ社製) を用いて精製した。この3.8kbのDNA断片と、実施例2-

(1) - (2) で調製した、片方の端に野生型loxP配列が他方の端に変異型loxP配列が各一ヶ結合した直鎖状DNA (約4.4kb) をligation後、大腸菌を形質転換し、

- 5 この操作を行ったプラスミドの総称で、実際には表1の#11, #21, #22, #23, #31, #41, #51, #61, #71, #72, #73, #81に対応する変異型loxP配列と野生型loxP配列とを各一ヶを有する個々のプラスミドを作製した。

(2) 野生型loxP配列と変異型loxP配列を含む基質DNAの調製

- 10 プラスミドpBLAmutantから、Cre依存組換え反応に基質に用いる野生型loxP配列と変異型loxP配列とを有する直鎖状DNAを調製するため以下の操作を行った。

- プラスミドpBLAmutantには、挿入したアデノウイルスゲノム部分に制限酵素NcoIサイトが一ヶ所存在するので、このプラスミドを制限酵素NcoIで消化し直鎖状DNAとし、反応液をアガロース電気泳動後約8.2kbのバンドを切り出し、GEANCLEAN II (フナコシ社製) を用いて精製した。この8.2kbの直鎖状DNAを次に
- 15 示す反応の基質として用いた。

(2) 野生型loxP配列と変異型loxP配列との間でのCre依存組換え反応

- 前述した基質DNAを実施例1-(4) で示した反応液に加え、37°Cで30分Cre依存組換え反応を行った。反応終了後、反応液に45 μ lのTEバッファー (pH8.0) 及び5 μ lのEDTA溶液 (pH8.0) を加え、フェノールクロロホルム抽出ならびに
- 20 クロロホルム抽出を行い、さらにエタノール沈殿し、得られたDNAをRNaseA (20 μ g/ml) を含むTEバッファー (pH8.0) 30 μ lに溶解した。次いで、その半量を制限酵素DraI消化し、アガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウム (EtBr) 染色により検出されたDNAのバンドを解析した。

- 基質として用いた直鎖状DNAには、野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に
- 25 DraIサイトが2ヶ所存在するので、Creによる組換えが起きない場合は、DraI消

消化後EtBrで染色したDNAをアガロースゲル電気泳動後、臭化エチジウム (EtBr) 染色により検出されたDNAのバンドを解析した。

直鎖状DNAを生じる場合、DraI消化後、約3.8kb、3.3kb、0.7kb、0.4kbの4つの

が生じる。従って、3.8kb及び3.3kbのバンドの存在はCreによる組換え反応が起きたことを示し、5.9kb及び1.3kbのバンド存在はCreによる組換え反応が起きていないことを示すので、これらのバンドの量比により組み換え反応の効率が分かる。さらに、実施例2-(2)で説明した反応の中間体は、このアッセイでは10
5 数kbの位置に検出された。結果を以下にまとめた。

- #11, 81 : 反応は最終段階まで進む；
- #21, 22, 23, 31, 41 : 反応は中間体で止まり、最終段階まで進まない；
- #51 : 反応は大部分中間体で止まるが、ごく一部最終段階まで進む；
- #61 : 中間体はほとんどできないが、一部最終段階まで進む；
- 10 #71 : 中間体はほとんどできないが、一部最終段階まで進む（最終産物は
#72, 73より多い）；
- #72, 73 : 中間体はほとんどできないが、ごく一部最終段階まで進む。

以上の結果より、実施例2よりも感度の高い方法でアッセイを行っても傾向は同じで、野生型loxP配列との間では特異的DNA組換え反応が起きないと報告

- 15 (Hoess et al., Nucleic Acids Res., Vol. 14, 2287-2300 (1986)) されている
変異型loxP配列（#71に相当）でも、野生型loxP配列との反応性は一部残っており、その程度（最終反応物の量）は同じ箇所の置換である#72や#73よりも高く、
#71の置換は野生型loxP配列との反応性を欠失させるためには不十分であることが再度確認された。

20 実施例4

2つの塩基を置換した変異型loxP配列と野生型loxP配列との間でのCre依存組換え反応

(1) 野生型loxP配列と変異型loxP配列との間でのCre依存組換え反応

(1) 野生型loxP配列と変異型loxP配列とを含む基質DNAの調製

- 25 直鎖状DNAの片側の端に野生型loxP配列を、他方に変異型loxP配列を有する基

（1）実施例2に記載の制限酵素消化法により、2つの塩基置換を含む変異型loxP配列と野生型loxP配列とを含む基質DNA（21）を調製する（参照）。この基質DNAを直鎖状DNAを基質DNAとして調

製した。

[2] Cre依存組換え反応（その1）

[1] で調製した基質DNAを用い、実施例 1 - (4) に示した方法でCre依存組換え反応を行い解析した。その結果を表 2（右欄）に示す。

表 2. 野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列間の Cre 依存組換え反応(2塩基置換)

配列 番号	合成 DNA 番 号	変異型 loxP 配列— 変異型 loxP 配列		野生型 loxP 配列— 変異型 loxP 配列	
		中間体 (970bp)	最終反応体 (920bp)	中間体 (970bp)	最終反応体 (920bp)
1	wild	1	9	1	9
20	#71	1	6	0	1
26	#2171	3	3	0	0
27	#2172	4	2		
28	#2173	6	0		
29	#2271	2	6		
30	#2272	1	6	0	0
31	#2273	3	4		
32	#2371	3	2		
33	#2372	2	0		
34	#2373	6	1	0	0
35	#3171	4	7	0	0
36	#3172	0	0		
37	#3271	3	4		
38	#3272	6	2	0	0
39	#3371	5	5		
40	#3372	6	1		
41	#3373	6	2	0	0
42	#4171	0	4	0	0
43	#4172	2	4		
44	#4271	4	2		
45	#4272	4	1	0	0
46	#4371	4	2		
47	#4372	3	2		
48	#4373	7	0	1	0
49	#5171	0	6	0	0
50	#5272	1	4	0	0
51	#5373	1	2	0	0
52	#6171	0	6	1	1

(表中、反応の中間体及び最終反応体の量を0～9までの10段階で表示した。数字が大きいほど生成量が多い。2つの野生型loxP配列間で反応を行った場合の最終反応体の量(DNAバンドの濃さ)を最大の「9」とし、DNAのバンドがほとんど検出できない場合(「9」の5%未満)を「0」とした。反応の中間体の詳細については、実施例2-(2)での説明を参照されたい。)

#6171の変異型loxP配列を用いた場合は最終反応体(920bp)が一部認められ、野生型loxP配列との間で組み換え反応が生じた。しかし、それ以外の解析された変異型loxP配列は野生型loxP配列とは全く反応せず、その程度は1塩基置換の変異型loxP配列の場合よりもさらに少なかった。

10 (3) 野生型loxP配列と変異型loxP配列とを有するプラスミドの構築

#2171、#2272、#2373の変異型loxP合成DNAを用い、実施例2-(1)-(2)及び3-(1)-(1)に示した方法で、野生型loxP配列と変異型loxP配列とを有するプラスミドpBLAmutant(8.2kb、図9参照)を3種類構築した。

(4) Cre依存組換え反応(その2)

15 (3)で構築したプラスミドを制限酵素NheIで消化し、実施例3-(1)-(2)に示した方法で野生型loxP配列と変異型loxP配列とを有する直鎖上の基質DNA(8.2kb)を調製した。この基質DNAを用い、実施例3-(2)で示した方法でCre依存組換え反応を行い解析した。その結果、3種類の変異型loxP配列いずれの場合とも、反応の中間体及び最終反応体はほとんど生じなかった。すなわち、
20 2塩基を置換した変異型loxP配列は、野生型loxP配列との組換え反応をほとんど起こさず、反応の特異性は1塩基置換の変異型loxP配列の場合よりもさらに高まったことが示された。

(2) 2つの同じ配列の変異型loxP配列間でのCre依存組換え反応

(1) 2つの変異型loxP配列を含む基質DNAの調製

25 29種類の変異型loxP配列(図4及び図5参照)について、実施例1-(3)に

野生型loxP配列と変異型loxP配列とを有する直鎖上の基質DNA(8.2kb)を調製した。

変異型loxP配列と変異型loxP配列とを有する直鎖上の基質DNAを調製した。

[2] Cre依存組換え反応 (その1)

[1] で調製した基質DNAを用い、実施例1-(4)に示した方法でCre依存組換え反応を行い解析した。その結果を表2(左欄)に示す。#2173や#2372のように全く組換え反応が起こらない変異型loxP配列もあったが、#2271、#2272、#3171、
5 #3371、#4171、#6171、#6171は1塩基置換の変異型loxP配列とほぼ同程度、#2171、#2273、#3271、#4172は1塩基置換の変異型loxP配列の半分程度の効率で組換え反応が起きていることを確認した。

[3] 変異型loxP配列を一つ有するプラスミドの構築

#2171、#2272、#2373の変異型loxP合成DNAを用い、実施例2-(1)-(1)に
10 示した方法で、プラスミドpBR322のNheIサイトとEcoNIサイトとの間にそれぞれの変異型loxP配列を一つ挿入した3種類のプラスミド(pBR2171、pBR2272、pBR2373、各4.4kb、図7参照)を構築した。

[4] 2つの同じ配列の変異型loxP配列を有するプラスミドの構築

[3] で構築した3種類のプラスミド(pBR2171、pBR2272、pBR2373)をそれぞれ
15 制限酵素SalIで消化し、プラスミドに挿入されているのと同じ配列の変異型loxP合成DNA(#2171、#2272、#2373)をそれぞれligation後、実施例2-(1)-(2)及び実施例3-(1)-(1)に示した方法で、2つの同じ配列の変異型loxP配列を有する3種類のプラスミド(pBLA2171x2、pBLA2272x2、pBLA2373x2、各8.2kb、図9参照)を構築した。

20 [5] Cre依存組換え反応 (その2)

[4] で構築した3種類のプラスミドを制限酵素NheIでそれぞれ消化し、実施例3-(1)-(2)に示した方法で2つの同じ配列の変異型loxP配列を有する直鎖上の基質DNA(8.2kb)を調製した。この基質DNAを用い、実施例3-(2)で示した方法でCre依存組換え反応を行い解析した。その結果、変異型loxP配列
25 #2272間での組換え反応は、野生型loxP配列間での組換え反応とほぼ同程度の非

表2 Cre依存組換え反応の結果 (変異型loxP配列間の組換え反応)

変異型loxP配列間の組換え反応の結果 (Cre依存組換え反応の検討)

(1) 異なる配列の変異型loxP配列を有するプラスミドの構築

(2) - (3) で構築したプラスミドpBR2171及びpBR2272をそれぞれ制限酵素SalIで消化し、プラスミドに挿入されている変異型loxP配列とは異なる配列の変異型loxP合成DNA (pBR2171は#2272もしくは#2373と、pBR2272は#2373と) と
5 ligation後、実施例2 - (1) - (2) 及び実施例3 - (1) - (1) に示した方法で、2つの異なる配列の変異型loxP配列を有する3種類のプラスミド (pBLA2171-2272、pBLA2171-2373、pBLA2272-2373、各8.2kb、図4参照) を構築した。

[2] Cre依存組換え反応

10 (1) で構築したプラスミドを制限酵素NheIで消化し、実施例3 - (1) - (2) に示した方法で2つの異なる配列の変異型loxP配列を有する直鎖上の基質DNA (8.2kb) を調製した。この基質DNAを用い、実施例3 - (2) で示した方法でCre依存組換え反応を行い解析した。その結果、3種の異なる配列 (#2171、#2272、
15 #2373) の変異型loxP配列間では、いずれの組み合わせともCre依存組換え反応は全く起きなかった。すなわち、それぞれの変異型loxP配列は他のloxP配列と交叉反応しないことが示された。

以上、(1) から (3) の結果より、2つの塩基を同時に置換した変異型loxP配列は、一塩基のみ置換した変異型loxP配列より認識特異性が高まった。すなわち、2つの塩基を同時に置換した変異型loxP配列は、野生型loxP配列及び異なる
20 変異型loxP配列とは反応せず、かつ同じ配列の変異型loxP配列どうしでは野生型loxP配列どうしと同程度反応することが明らかに示された。さらに、変異の部位としては、loxP配列のスーパー領域の2番目、3番目、4番目、5番目の内うちの一つの塩基と、7番目の塩基との組み合わせが好ましく、かつ同じ塩基部位
25 であっても置換する塩基の種類により、反応性及び反応特異性が異なることが示された。以上の結果より、本発明の目的とする変異型loxP配列として、具体的に

野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に挿入された遺伝子の置換に必要なプラスミド及びコスミドベクターの構築

(1) 遺伝子置換のターゲット側のプラスミド及びコスミドベクターの構築

5 [1] 2つの野生型loxP配列間にクローン化部位 (SwaIサイト) を持つプラスミド (puLwL) の構築

プラスミドpUC119の制限酵素Ecl136IIサイトに、野生型loxP配列が同方向に2つ挿入されたプラスミドpuLL (鐘ヶ江ら、Nucleic acids Res., Vol. 23, 3816-3821 (1995)) の、2つのloxP配列間に存在するクローン化部位を制限酵素NruIサイトからSwaIサイトに変えるため以下の操作を行った。

10 puLLを制限酵素NruIで消化し、SwaIリンカー (5'-pGATTTAAATC-3'、配列番号: 61) をligation後、再度NruIで消化した。NruIによる再度の消化は、SwaIリンカーが結合せずにNruIサイトが再生したプラスミドを除くために行った。反応液で大腸菌を形質転換し、2つの野生型loxP配列間にクローン化部位としてSwaIサイトを持つプラスミドpuLwL (3.3kb、図11中のA) を得た。

15 [2] 野生型loxP配列と変異型loxP配列との間にクローン化部位 (SwaIサイト) を持つプラスミド (pulwM及びpuMwL) の構築

プラスミドpulwLの2つの野生型loxP配列のうちの一つを変異型loxP配列に置換した2種類のプラスミドを構築するため、以下の(A)、(B)の各操作を行った。プラスミドpuLwM (図11中のB) は、同図に示したpuLwLの左側の野生型loxP配列を、プラスミドpuMwL (図11中のC) は右側の野生型loxP配列をそれぞれ変異型loxP配列に置換したものである。なお、ここで変異型loxP配列として、野生型loxP配列のスペーサー部分の2番目と7番目の塩基を同時に変異させた#2171 (配列番号: 26) の配列を用いた。以下の実施例での変異型loxP配列とは、全てこの配列のものである。

25 (A) pulwMの構築

形質転換 野生型、変異型、変異型loxP配列間にSwaIサイトを挿入したプラスミド

を大腸菌に導入し、形質転換した。変異型loxP配列は、変異型loxP配列を有するプラスミドpulwMの全長DNA部分の塩基配列を

解読し、野生型loxP配列及び変異型loxP配列が目的通り挿入されていることを確認した。なお、用いた合成DNAは一方の端はXhoI消化断片であるが他方はSalI消化断片になるように設計したので、プラスミドpuLwMの野生型loxP配列内のXhoIサイトは消滅している。

5 (B) puMwLの構築

puLwLを制限酵素MluIで消化し、変異型loxP配列を含む60bpの合成DNA（図13、上側の鎖の配列番号：59、下側の鎖の配列番号：60）をligation後大腸菌を形質転換し、変異型loxP配列と野生型loxP配列間にSwaIサイトを持つプラスミドpuMwL(3.3kb)を得た。さらに、プラスミドpuLwMの場合と同様、puMwLの合成DNA
10 部分の塩基配列を解読し確認した。なお、用いた合成DNAは一方の端はMluI消化断片であるか他方はBssHII消化断片になるように設計したので、プラスミドpuMwLの野生型loxP配列内のMluIサイトは消滅している。

〔3〕CAGプロモーターのクローン化部位に2つの野生型loxP配列を挿入したプラスミド（pCALL）の構築

15 CAGプロモーターのプロモーター部とポリA配列との間に2つの野生型loxP配列を挿入したプラスミドを得るため以下の両DNAを調製した。なお、ここに言うCAGプロモーターとは、高発現ベクターとして特開平3-168087号公報に開示されているものである。

(a)CAGプロモーターを含むプラスミドpCAGGS（Niwa et.al., Gene, Vol.108, 193-200(1991)）のクローン化部位であるEcoRIサイトをSwaIサイトに変えたプラスミドpCAGw（特開平8-84589号公報10頁）を制限酵素SwaIで消化したDNA。
20

(b)プラスミドpuLL（〔1〕に記載）を制限酵素BamHI及びEcoRIで同時に消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動により回収した2つの野生型loxP配列を含む約100bpのDNA断片。

25 (a)(b)両DNAを断片をligationし、制限酵素SwaI消化後大腸菌を形質転換し、

〔4〕pCALLの構築

〔3〕で得たpCAGwと〔1〕で得たpuLLをligationし、制限酵素SwaIで消化し、大腸菌を形質転換し、pCALLを得た。

NruIサイトからSwaIサイトに変えるため以上の操作を行った。

pCALLを制限酵素NruIで消化し、SwaIリンカー（5'-pGATTTAAATC-3'、配列番号 61）をligation後、再度制限酵素NruIで消化した。NruIによる再度の消化の理由は〔1〕と同じである。反応液で大腸菌を形質転換し、CAGプロモーター内に2つの野生型loxP配列が存在し、かつその間にクローン化部位としてSwaIサイトを
5 持つプラスミドpCALwL(4.9kb、図1.4中のD)を得た。

〔5〕 CAGプロモーター内に野生型loxP配列と変異型loxP配列を挿入したプラスミド（pCALwM）の構築

プラスミドpCALwLの野生型loxP配列の一つを変異型loxP配列に置換したプラスミドを得るため以下の両操作を行った。
10

(a) プラスミドpCALwLを制限酵素MluI及びXhoIで同時に消化後、アガロースゲル電気泳動により野生型loxP配列を含まない約4.8kbの断片を回収した。

(b) プラスミドpULwMを制限酵素MluI及びXhoIで同時消化後アガロースゲル電気泳動し、野生型及び変異型loxP配列を含む100bpのDNA断片を回収した。

15 (a)(b)で調製した両DNAをligation後大腸菌を形質転換し、プラスミドpCALwM(4.9kb 図1.4中のE)を得た。pCALwMは、プロモーター／野生型loxP配列／SwaIサイト（クローン化部位）／変異型loxP配列／ポリA配列の構造を有するプラスミドである。

〔6〕 組換えアデノウイルス作製用コスミドベクター（pAxCALwM）の作製

20 〔5〕で作製したプラスミドpCALwMの、プロモーターからポリA配列までの部分を挿入したコスミドベクターを作製するため以下の両操作を行った。なお、コスミドベクターの作製は既存の方法（Miyake et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.93, 1320-1324(1996)、及び特開平7-298877号公報）に従った。

(a) アデノウイルス5型のE1及びE3遺伝子以外のほぼ全長が挿入されたカセット
25 コスミドpAxcw（特開平8-308585号公報15頁）を制限酵素SwaIで消化した。

〔7〕 組換えアデノウイルスの調製

〔6〕で調製した両DNAを同時に消化し、回収した断片を混合し、これを

・パッケージングキット（ギガパックXL、Stratagene社製）を用いてパッケージング反応を行い、反応液を大腸菌に感染させカセットコスミドpAxCALwM(44.9kb)を得た。

(2) 遺伝子置換のターゲット側のプラスミドの構築

- 5 (1) 野生型loxP配列と変異型loxP配列との間にlacZ遺伝子を挿入したプラスミド(puLZM)の構築

プラスミドpuLwM（(1)～(2)に記載）の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に大腸菌lacZ遺伝子を挿入したプラスミドを得るため以下の両操作を行った。

- 10 (a) プラスミドpuLwMを制限酵素SwaIで消化後、アガロースゲル電気泳動により直鎖状のDNA断片を回収した。

(b) プラスミドpSRlacZ（Miyake et al., Proc.Natl.Acad.Sci., Vol.93, 1320-1324(1996)）を制限酵素SalI及びPstIで同時に消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動によりlacZ遺伝子を含む約3.1kb

- 15 のDNA断片を回収した。

(a)(b)で調製した両DNAをligationし、制限酵素SwaI消化後大腸菌を形質転換し、プラスミドpuLZM(6.4kb、図15中のF)を得た。

(2) 野生型loxP配列と変異型loxP配列との間にSV40の複製オリジン(ori)及びポリA配列を挿入したプラスミド(puMOL)の構築

- 20 プラスミドpuMwLの野生型loxP配列と変異型loxP配列との間にSV40のori及びポリA配列挿入したプラスミドを得るため以下の両操作を行った。

(a) プラスミドpuMwL（(1)～(2)に記載）を制限酵素SwaIで消化後、アガロースゲル電気泳動により直鎖状のDNA断片を回収した。

- 25 (b) プラスミドpCAGGS（(1)～(3)に記載）を制限酵素BamHI消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化した後、アガロースゲル電気泳動によりSV40の

（付図15）図15は、本発明の遺伝子置換のターゲット側のプラスミドの構築を示す。

（付図15）図15は、本発明の遺伝子置換のターゲット側のプラスミドの構築を示す。野生型loxP配列（lacZ遺伝子）と変異型loxP配列（SV40のori及びポリA配列）との間にlacZ遺伝子を挿入したプラスミド(puLZM)の構築を示す。

／野生型loxP配列を挿入したプラスミド (puLZMOL) の構築

プラスミドpuLZMから変異型loxP配列を除き、プラスミドpuMOLの、変異型loxP配列、SV40のori及びポリ A配列／野生型loxP配列を含む断片を挿入するため以下の操作を行った。

- 5 (a) プラスミドpuLZMを制限酵素NheI及びXhoIで同時に消化後、アガロースゲル電気泳動により野生型loxP配列とlacZ遺伝子を含む約6.4kbのDNA断片を回収した。
- (b) プラスミドpuMOLを制限酵素NheI及びXhoIで同時に消化後、アガロースゲル電気泳動により、変異型loxP配列／SV40のori及びポリ A配列／野生型loxP配列を含む約440bpのDNA断片を回収した。
- 10 (a)(b)で調製した両DNAをligationし、制限酵素SmaI消化後大腸菌を形質転換し、プラスミドpuLZMOL(6.8kb、図16中のH)を得た。

[4] プラスミドpuLZMOLのlacZ遺伝子の5'上流にチミジンキナーゼ遺伝子のポリ A配列を挿入したプラスミド (puALZMOL) の構築

- 単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) のチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子のポリ
- 15 A配列を、プラスミドpuLZMOLに挿入したプラスミドを構築するため次の両操作を行った。
- (a) プラスミドpuLZMOLを、lacZ遺伝子の5'上流側の野生型loxP配列の5'上流で一ヶ所切断したDNA断片を得るため以下の操作を行った。puLZMOLを制限酵素SmaIで消化し次いで制限酵素KpnIで消化後、アガロースゲル電気泳動により約6.8kbの
- 20 直鎖状DNA断片を回収した。
- (b) プラスミドpTKは、HSV-1のTK遺伝子を含む約3.6kbのBamHI消化断片が、pBR322のBamHIサイトに挿入されたプラスミドである (M. Wigler et. al. Cell, Vol. 14, 725-731 (1978))。pTKを制限酵素SmaI及びNcoI消化すると、約320bpのTK遺伝子のポリ A配列が切り出せる。かつ切り出したDNA断片の両端をSmaI及び
- 25 KpnIサイトにするため以下の操作を行った。プラスミドpTKを制限酵素NcoIで消

SmaI消化後、SmaIで切り出したTK遺伝子のポリ A配列を含むDNA断片を回収した。

回収したDNA断片をligationし、

(a) (b) で調製した両DNAをligation後、大腸菌を形質転換しプラスミドpuALZMOL (7.1kb、図1-6中のI)を得た。puALZMOLは、TK遺伝子のポリA配列／野生型loxP配列／lacZ遺伝子／変異型loxP配列／SV40のori及びポリA配列／野生型loxP配列、の構造を有するプラスミドである。なお、この過程でTK遺伝子のポリA配列を挿入したのは、これら一連の遺伝子を有する組換えアデノウイルスを作製した場合、挿入部位の上流にある未同定のアデノウイルス由来のプロモーターからlacZ遺伝子の転写が起こらないようにするためである。

[5] 組換えアデノウイルス作製用コスミドベクター (pAxALZMOL) の作製

プラスミドpuALZMOLの挿入遺伝子 (TK遺伝子のポリA配列／野生型loxP配列／lacZ遺伝子／変異型loxP配列／SV40のori及びポリA配列／野生型loxP配列) を挿入したコスミドベクターを作製するため以下の操作を行った。

プラスミドpuALZMOLを制限酵素XbaI及びXhoI及びDraIで同時消化し、さらにKlenow酵素により両端を平滑化後、反応液をアガロースゲル電気泳動し約4.5kbのDNA断片を回収した。このDNA断片と制限酵素SwaIで消化したカセットコスミドpAxcw ((1) - [6] で調製) とをligationし、制限酵素SwaIで消化後、反応液の一部をラムダ・イン・ビトロ・パッケージングキット (キガパックスXL Stratagene社製) を用いてパッケージング反応を行い、反応液を大腸菌に感染させカセットコスミドpAxALZMOL (46.7kb) を得た。

実施例6

20 遺伝子置換に必要な組換えアデノウイルスの作製

(1) 遺伝子置換のターゲット用組換えアデノウイルス (AxCALwM) の作製

非増殖型アデノウイルスベクター (E1及びE3遺伝子を欠失) のE1遺伝子欠失部位に、プロモーター／野生型loxP配列／SwaIサイト (クローニング部位) ／変異型loxP配列／ポリA配列 を挿入した組換えアデノウイルスを作製するため以下の操作を行った。なお、組換えアデノウイルスの作製は既存の方法 (Miyake et

al) を用いて行われた。Miyake et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1719-1723, 1979) は、アデノウイルスDNAの末端蛋白質複合体

を制限酵素EcoT22I消化した。このウイルスDNA-末端蛋白質複合体と、実施例5

- (1) - (6) で作製したコスミドベクターpAxCALwMとを用いリン酸カルシウム共沈法で293細胞を形質転換した。生じた組換えアデノウイルスのクローニングならびにウイルスの選別を行い、目的の組換えウイルスAxCALwM (図17) を得た。この組換えウイルスを継代し、高力価の4次ウイルス液もしくは5次ウイルス液をCsCl超遠心法にて精製 (Y. Kanegae et al., Jpn. J. Med. Sci. Biol., Vol. 47, 157-166 (1994)) したウイルス液を以後の実験に用いた。

(2) 遺伝子置換のドナー用組換えアデノウイルス (AxALZMOL) の作製

- 非増殖型アデノウイルスベクター (E1及びE3遺伝子を欠失) のE1遺伝子欠失部位に、TK遺伝子のポリA配列/野生型loxP配列/lacZ遺伝子/変異型loxP配列、SV40のori及びポリA配列/野生型loxP配列、を挿入した組換えアデノウイルスを作製するため以下の操作を行った。

- 制限酵素EcoT22I消化したAd5-dlXのウイルスDNA-末端蛋白質複合体と、実施例5 - (2) - (5) で作製したコスミドベクターpAxALZMOLとをリン酸カルシウム共沈法で293細胞を形質転換し、(1)と同様の方法で目的の組換えウイルスAxALZMOL (図17) を得た。この組換えウイルスも4次ウイルス液もしくは5次ウイルス液をCsCl超遠心法にて精製したウイルス液を以後の実験に用いた。

実施例7

細胞の染色体上に存在する遺伝子の置換に用いる細胞株の作製

- (1) ハイグロマイシンB耐性遺伝子を発現する遺伝子置換用細胞株の作製

(1) 野生型loxP配列と変異型loxP配列との間にクローン化部位を有するレポーター遺伝子挿入用プラスミド (pCALwMds) の構築

- 実施例5 - (1) - (5) で作製したプラスミドpCALwM (図14中のE) は、プラスミドpCAGGS (実施例5 - (1) - (3) に記載) のCAGプロモーター内のクローン化部位であるEcoRIサイトに、野生型loxP配列/クローン化部位 (SwaIサイト) /変異型loxP配列を挿入したプラスミドである。このpCALwMから、SV40の

大腸菌を形質転換し、ハイグロマイシンB耐性株 (図18中のA) を得た。

[2] ハイグロマイシン B 耐性遺伝子を挿入したプラスミド (pCALhmBMds) の構築

プラスミド pCALwMds の SmaI サイトにハイグロマイシン B 耐性遺伝子を挿入したプラスミドを構築するため、以下の両 DNA を調製した。

- 5 (a) プラスミド pCALwMds を制限酵素 SmaI で消化した DNA 断片。
(b) プラスミド pCHD2L (Ikeda et al., Gene, Vol. 71, 19-27 (1988)) を制限酵素 SmaI 及び DraI で同時に消化後、アガロース電気泳動により回収したハイグロマイシン B 耐性遺伝子を含む約 1.1 kb の DNA 断片。

- (a) (b) 両 DNA を ligation 後大腸菌を形質転換し、プラスミド pCALhmBMds (5.7 kb、
10 図 18 中の B) を得た。pCALhmBMds は、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子が CAG プロモーター内の野生型 loxP 配列と変異型 loxP 配列との間に挿入されたプラスミドである。

[3] ハイグロマイシン B 耐性遺伝子を発現する形質転換細胞株の作製

- 細胞の染色体上に、プロモーター/野生型 loxP 配列/ハイグロマイシン B 耐性
15 遺伝子/変異型 loxP 配列/ポリ A 配列、の外来 DNA を 1 コピー有する形質転換細胞株を得るため、以下の操作を行った。なお、細胞の形質転換は、Chen-Okayama 法によるリン酸カルシウム-DNA 共沈殿法にて行った。

- (i) [2] で調製したプラスミド pCALhmBMds 20 μ g を終濃度 250mM の塩化カルシウム溶液に溶解 (液量 100 μ l) し、100 μ l の 2 x BBS 溶液 (50mM N,N-bis[2-
20 hydroxyethyl]-2-aminoethane sulfonic acid / 280mM NaCl₂ / 1.5mM Na₂HPO₄ (pH6.95)) を加えた後、5% FCS 添加 DMEM 培地で培養した 6cm シャーレの CV-1 細胞に添加し、3% CO₂ 存在下 35°C で約 24 時間培養した。

- (ii) 培養液を除き、PBS (-) で細胞を洗浄後、10% FCS 添加 DMEM 培地を添加し、5% CO₂ 存在下 37°C で一晩培養した

- 25 (iii) 6cm シャーレから細胞をはがし 96 穴プレートにまきかえ、さらに一晩培養後、

細胞を電気伝導率測定用培地に播種し、細胞の増殖をモニターする。

細胞増殖が確認された後、細胞を DNA を抽出し、形質転換に用いたプラスミド

pCALhmBMDsには認識部位が存在しない制限酵素PvuIIで、このゲノムDNAを消化後電気泳動し、プラスミドpCALhmBMDの全長をプローブに用いてサザンブロットを行い、細胞の染色体上に目的の遺伝子が1コピーのみ挿入された形質転換細胞を18株得た。なお、目的の遺伝子が1コピーのみ挿入されていることは、プラスミドpCALhmBMDに認識部位が1ヶ所のみ存在する制限酵素EcoRIで、細胞のゲノムDNAを消化後に行ったサザンブロットでも確認した。

(2) ブレオマイシン耐性遺伝子を発現する遺伝子置換用細胞株の作製

[1] ブレオマイシン耐性遺伝子を挿入したプラスミド (pCALGFBMDs) の構築

プラスミドpCALwMdsのSwaIサイトにブレオマイシン耐性遺伝子を挿入したプラスミドを構築するため、以下の操作を行った。

プラスミドpTracer-CMV (Invitogen社製) を制限酵素PmaCI消化後アガロース電気泳動を行い、緑色蛍光蛋白質 (green fluorescent protein: GFP) とブレオマイシン耐性遺伝子との融合蛋白質の遺伝子を含む約1.1kbのDNA断片を回収した。このDNA断片と、制限酵素SwaI消化したプラスミドpCALwMds ((1) - [2] で調製) とをligationし、制限酵素SwaI消化後大腸菌を形質転換しプラスミドpCALGFBMDs (5.7kb、図18中のC) を得た。pCALGFBMDsは、GFPとブレオマイシン耐性遺伝子との融合蛋白質の遺伝子がCAGプロモーター内の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に挿入されたプラスミドである。

[2] ブレオマイシン耐性遺伝子を発現する形質転換細胞株の作製。

細胞の染色体上に、プロモーター／野生型loxP配列／GFPとブレオマイシン耐性遺伝子との融合蛋白質の遺伝子／変異型loxP配列／ポリA配列、の外來DNAを1コピー有する形質転換細胞株を得るため、以下の操作を行った。

基本的には、(1) - (3) で示したハイグロマイシンB耐性細胞株の作製方法と同じであるので、以下に相違点のみ示す。CV-1細胞の形質転換は、[2] で作製したプラスミドpCALGFBMDsを用いた。形質転換細胞株の選択薬剤は、ブレオ

マイシン

を用いた。

細胞の染色体上に、目的の遺伝子が1コピーのみ挿入

を、挿入遺伝子の発現の強弱により分類するため、GFPの発現量を測定した。GFPの発現量は、478nmの励起光により発光した507nmの蛍光を観測することにより行い、GFPの発現の強い細胞株（C18, C35）、中程度の細胞株（C29, C38）、弱い細胞株（C19, C30）に分類された（数字は細胞株の番号）。

5 実施例 8

アデノウイルスゲノム上に存在する遺伝子の置換

野生型loxP配列と変異型loxP配列との組み合わせにより、プラスミドDNA（環状DNA）上に存在するlacZ遺伝子をアデノウイルスゲノム上に置換できることを実証するために以下の実験を行った。本実験の原理は次の通りである（図17）。

- 10 実施例6で作製したドナー用組換えアデノウイルスAxALZMOLは、TK遺伝子のポリA配列、野生型loxP配列、lacZ遺伝子、変異型loxP配列、SV40のori及びポリA配列、野生型loxP配列、が挿入されている。このウイルスと実施例1で示したCre発現組換えアデノウイルスAxCANCreとを培養細胞に同時感染すると、2つの
- 15 loxP配列を有するアデノウイルス(a)と、野生型loxP配列、lacZ遺伝子、変異型loxP配列、SV40のori及びポリA配列、の構造を有する環状DNA(b)が生じる。2つの野生型loxP配列を挿入した組換えアデノウイルスとCre発現組換えアデノウイルスとを用いたこの反応の効率は非常に高く（鐘ヶ江ら、Nucleic acids Res., Vol. 23, 3816-3821(1995)）、ほぼ100%の培養細胞でアデノウイルス(a)と環状
- 20 DNA(b)が生成することが予測される。環状DNA(b)は、SV40 oriのプロモーターを有するが、その転写は直後のSV40ポリA配列によりブロックされるため、lacZ遺伝子は発現しない。この環状DNA(b)が生成した細胞に、さらに実施例6で作製したターゲット用組換えアデノウイルスAxCALwMを感染させると、環状環状DNA(b)とAxCALwMとの間で組み換え反応が起こり、野生型loxP配列及び変異型loxP配列
- 25 を各2ヶ有する中間体を経て、プロモーター、野生型loxP配列、lacZ遺伝子、変

異型loxP配列を有する環状DNA(c)が生成する。この環状DNA(c)は、lacZ遺伝子を発現する。

実際の実験では、ドナー用組換えアデノウイルスAxALZMOL、Cre発現組換えアデノウイルスAxCANCre、ターゲット用組換えアデノウイルスAxCALwMを同時に感染させた。

デノウイルスAxCANCre、ターゲット用組換えアデノウイルスAxCALwMの3種類のウイルスを同時に培養細胞(CV-1細胞もしくはCOS-1細胞)に感染させた。それぞれのウイルスのmoi(重複感染度)は次の通りである。ターゲット用組換えアデノウイルス:moi=9、Cre発現組換えアデノウイルス:moi=5または15、ドナー用組換えアデノウイルス:moi=10、30、60、100、200。1時間のウイルス感染後、
5 培地を加え培養した。3日後、培養液を除きPBS(-)で細胞面を洗浄後、0.25%グルタルアルデヒド液を加え4°Cで10分間細胞を固定後、再度PBS(-)洗浄し、X-Gal染色液(5mMフェリシアン化カリウム/5mMフェロシアン化カリウム/2mM塩化マグネシウム、1mg/ml X-Gal(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Galactoside) /
10 PBS(-))を加え一晩染色した。その結果を図19に示す。

図19は、Cre発現組換えアデノウイルスをmoi=15でCV-1細胞に感染させた場合の結果である。ドナー用組換えアデノウイルスのmoi=60では約60%、moi=100では約90%の細胞が青く染色された。また図19には示していないが、ドナー用組換えアデノウイルスのみ、及びドナー用組換えアデノウイルスとCre発現組換え
15 アデノウイルスを同時に感染させても青く染色される細胞は全く存在しなかった。さらに、Cre発現組換えアデノウイルスをmoi=5で感染させた場合、及びCOS-1細胞を用いて同じ実験を行った場合も図19とほぼ同様の結果であった。

以上の結果は、ドナー用組換えアデノウイルスのゲノム上に存在するlacZ遺伝子が、ターゲット用組換えアデノウイルスのゲノム上に挿入され、lacZ遺伝子が
20 プロモーターと直結し β -ガラクトシダーゼが発現した結果、細胞が青く染色されたことを示す。すなわち、ドナー用組換えアデノウイルスのゲノム上の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に存在するlacZ遺伝子が、環状DNAの形を介して、ターゲット用組換えアデノウイルスのゲノム上の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に非常に高い効率で置換されたことを明らかに証拠づけるもので
25 ある。

実施例8では、環状DNA上に存在する遺伝子を、細胞の染色体上の遺伝子と置換できることを示した。細胞の染色体上の遺伝子も置換できることを実証する。

め以下の実験を行った。その原理は実施例8と同じであるが、ターゲット用組換えアデノウイルスの代わりに、実施例7で作製したプロモーター／野生型loxP配列／ハイグロマイシンB耐性遺伝子／変異型loxP配列／ポリA配列、のDNAが染色体上に1コピー挿入された形質転換細胞株（ターゲット細胞）を用いた（図20）。

実施例7で作製したハイグロマイシンB耐性の任意の6株のターゲット細胞（C3、C7、C8、C11、C19、C28）に、それぞれCre発現組換えアデノウイルスAxCANCreをmoi=5で、ドナー用組換えアデノウイルスAxALZMOLをmoi=10、30、100、300で同時に1時間感染させ、培地を添加し培養した。3日後に、実施例8と全く同じ操作を行いβ-ガラクトシダーゼが発現した細胞を染色した。結果を図21に示す。細胞株により頻度は異なるが、ドナー用組換えアデノウイルスをmoi=100で感染した場合、10%（C19）から30%（C8）の細胞が青く染色された。ドナー用組換えアデノウイルスをmoi=300で感染すると、青く染色された細胞の割合はさらに増えたが、大量のアデノウイルス粒子による細胞毒性が認められた。また図には示していないが、ドナー用組換えアデノウイルスのみをmoi=100で感染しCre発現組換えアデノウイルスが存在しない場合は青く染色された細胞は全く存在しなかった。

以上の結果は、ドナー用組換えアデノウイルスのゲノム上の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に存在するlacZ遺伝子が、環状DNAの形を介して、ターゲット細胞の染色体上の野生型loxP配列と変異型loxP配列との間に高い効率で置換されたことを明らかに証拠づけるものである。

産業上の利用の可能性

本発明によって、リコンビナーゼCreの存在下、野生型loxP配列とは組換え反応が起きず、かつ同一配列の2つの変異型loxP配列での組換え反応は2つの野生型loxP配列間と同程度の効率で起こる変異型loxP配列が提供される。さらに本発

明は、新しい遺伝子挿入、遺伝子置換を行う方法を提供する。

図15は、図14の細胞株C19

配列番号：1の塩基配列は、野生型10xP配列である。

配列番号：2～54の塩基配列は、変異型10xP配列である。

配列番号：55の塩基配列は、野生型10xP配列と制限酵素認識部位を含むようにデザインされた配列のセンス鎖である。

- 5 配列番号：56の塩基配列は、野生型10xP配列と制限酵素認識部位を含むようにデザインされた配列のアンチセンス鎖である。

配列番号：57の塩基配列は、変異型10xP配列と制限酵素認識部位を含むようにデザインされた配列のセンス鎖である。

- 10 配列番号：58の塩基配列は、変異型10xP配列と制限酵素認識部位を含むようにデザインされた配列のアンチセンス鎖である。

配列番号：59の塩基配列は、変異型10xP配列と制限酵素認識部位を含むようにデザインされた配列のセンス鎖である。

配列番号：60の塩基配列は、変異型10xP配列と制限酵素認識部位を含むようにデザインされた配列のアンチセンス鎖である。

- 15 配列番号：61の塩基配列は、Swa Iリンカーである。

請求の範囲

1. 以下の性質をもつ変異型loxP配列：

- (a) 大腸菌P1ファージ由来の下記の野生型loxP配列において、中央部の8塩基
 5 (スパーサー領域)の2番目(T)、3番目(G)、4番目(T)又は5番目
 (A)の塩基のうち少なくとも一つの塩基及び6番目(T)又は7番目(G)の
 塩基のうち少なくとも一方の塩基が異なる塩基に置換され、スパーサー領域以外
 の領域は任意の塩基に置換されていてもよい配列からなり、

12345678

5'-ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT-3'

スパーサー領域

10

(b) リコンビナーゼCreの存在下でも野生型loxP配列との間で特異的DNA組
 換え反応が起こらず、

(c) リコンビナーゼCreの存在下、同一の配列を有するもう一つの変異型loxP
 配列との間で特異的DNA組換え反応が起こる。

15 2. 以下の性質をもつ変異型loxP配列：

- (a) 大腸菌P1ファージ由来の下記の野生型loxP配列において、中央部の8塩基
 (スパーサー領域)の2番目(T)、3番目(G)及び4番目(T)の塩基から
 選ばれる一つの塩基が異なる塩基に置換され、スパーサー領域以外の領域は任意
 の塩基に置換されていてもよい配列からなり、

12345678

5'-ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT-3'

塩基

5 (b) リコンビナーゼCreの存在下でも野生型loxP配列との間で特異的DNA組

換え反応が起こらず、

(c) リコンビナーゼCreの存在下、同一の配列を有するもう一つの変異型loxP配列との間で特異的DNA組換え反応が起こる。

3. リコンビナーゼCreの存在下でも異なる配列を有するもう一つの変異型
5 loxP配列との間で特異的DNA組換え反応が起こらない、請求項1又は2記載の変異型loxP配列。

4. 配列番号：26、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：35、
配列番号：39、配列番号：42又は配列番号：49で表される配列である請求
項1記載の変異型loxP配列。

- 10 5. 請求項1ないし4いずれかに記載の変異型loxP配列を有するDNA。

6. 少なくとも一つの野生型loxP配列及び請求項1又は2記載の変異型loxP
配列を少なくとも一つ有するDNA。

7. 野生型loxP配列と変異型loxP配列の間に所望の遺伝子が挿入された請求
項6記載のDNA。

- 15 8. 互いに異なる配列をもつ少なくとも2つの請求項3記載の変異型loxP配
列を有するDNA。

9. 互いに異なる配列をもつ2つの変異型loxP配列の間に所望の遺伝子が挿
入された請求項8記載のDNA。

- 20 10. 請求項6ないし9いずれかに記載のDNAによって形質転換された細
胞。

11. 下記のDNA(a)及びDNA(b)をリコンビナーゼCreの存在
下に反応させ、下記のDNA(c)を得ることからなる遺伝子置換方法。

(a) 野生型loxP配列、遺伝子A及び請求項1又は2記載の変異型loxP配列をこ
の順に有するDNA。

- 25 (b) 野生型loxP配列、遺伝子B及びDNA(a)と同じ変異型loxP配列をこの

(c) 野生型loxP配列、遺伝子C及び請求項1又は2記載の変異型loxP配列をこの

12. 下記のDNA(a)及びDNA(b)をリコンビナーゼCreの存在

下に反応させ、下記のDNA (c) を得ることからなる遺伝子置換方法。

(a) 互いに異なる配列をもつ2つの請求項3記載の変異型loxP配列(変異型loxP配列1及び変異型loxP配列2)及び遺伝子Aを変異型loxP配列1/遺伝子A/変異型loxP配列2の順に有するDNA。

5 (b) 変異型loxP配列1、遺伝子B及び変異型loxP配列2をこの順に有する環状DNA。

(c) DNA (a) において遺伝子Aが遺伝子Bに置換されたDNA。

ここで、遺伝子A及び遺伝子Bは互いに異なる任意の遺伝子である。

10 13. 遺伝子Bが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする請求項11又は12記載の方法。

14. 遺伝子Aが機能的な遺伝子ではないことを特徴とする請求項11又は12記載の方法。

15 15. DNA (a) が細胞の染色体DNAであり、DNA (b) がプラスミドDNA又は二本鎖環状DNAウイルスであることを特徴とする請求項11ないし14いずれかに記載の方法。

16. DNA (a) が細胞の染色体DNAであり、DNA (b) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状DNAとなる性質を有することを特徴とする請求項11ないし14いずれかに記載の方法。

20 17. DNA (a) が二本鎖DNAウイルスの染色体DNAであり、DNA (b) がプラスミドDNA又は二本鎖環状DNAウイルスであることを特徴とする請求項11ないし14いずれかに記載の方法。

18. DNA (a) が二本鎖DNAウイルスの染色体DNAであり、DNA (b) が細胞内で変換されることにより二本鎖環状DNAとなる性質を有することを特徴とする請求項11ないし14いずれかに記載の方法。

25 19. DNA (a) の二本鎖DNAウイルスがアデノウイルスであることを

： 断片

21. 請求項6ないし19いずれかに記載のDNAからなる医薬

FIG. 1

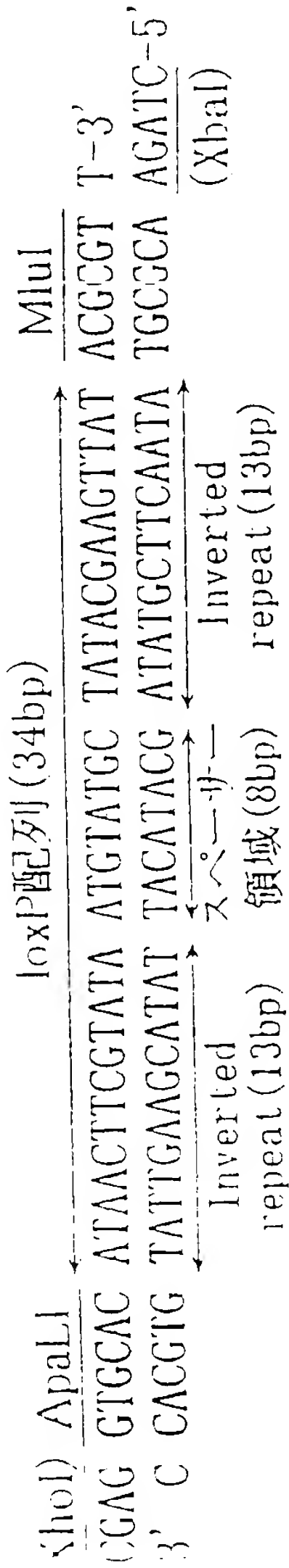


FIG. 2

1 塩基置換 (センス)

12345678

wilds 5' - ATGTATGC -3'
 11s 5' - GTGTATGC -3'
 12s 5' - TTGTATGC -3'
 13s 5' - CTGTATGC -3'
 21s 5' - ACGTATGC -3'
 22s 5' - AAGTATGC -3'
 23s 5' - AGGTATGC -3'
 31s 5' - ATATATGC -3'
 32s 5' - ATCTATGC -3'
 33s 5' - ATTTATGC -3'
 41s 5' - ATGCATGC -3'
 42s 5' - ATGAATGC -3'
 43s 5' - ATGGATGC -3'
 51s 5' - ATGTGTGC -3'
 52s 5' - ATGTTTGC -3'
 53s 5' - ATGTCTGC -3'
 61s 5' - ATGTACGC -3'
 62s 5' - ATGTAAGC -3'
 63s 5' - ATGTAGGC -3'
 71s 5' - ATGTATAC -3'
 72s 5' - ATGTATCC -3'
 73s 5' - ATGTATTG -3'

SEQ ID NO: 1

ATGTATGC

FIG. 3

1 塩基置換 (アンチセンス)

87654321

wilda 5' - GCATACAT -3'
 11a 5' - GCATACAC -3'
 12a 5' - GCATACAA -3'
 13a 5' - GCATACAG -3'
 21a 5' - GCATACGT -3'
 22a 5' - GCATACTT -3'
 23a 5' - GCATACCT -3'
 31a 5' - GCATATAT -3'
 32a 5' - GCATAGAT -3'
 33a 5' - GCATAAAT -3'
 41a 5' - GCATGCAT -3'
 42a 5' - GCATT CAT -3'
 43a 5' - GCATCCAT -3'
 51a 5' - GCACACAT -3'
 52a 5' - GCAAACAT -3'
 53a 5' - GCAGACAT -3'
 61a 5' - GCGTACAT -3'
 62a 5' - GCTTACAT -3'
 63a 5' - GCCTACAT -3'
 71a 5' - GTATACAT -3'
 72a 5' - GGATACAT -3'
 73a 5' - GAATACAT -3'

SEQ ID NO: 2

GCATACAT

FIG. 4

2塩基置換 (センス)

	12345678
wilds	5' - ATGTATGC -3'
2171s	5' - ACGTATAC -3'
2172s	5' - ACGTATCC -3'
2173s	5' - ACGTATTC -3'
2271s	5' - AAGTATAC -3'
2272s	5' - AAGTATCC -3'
2273s	5' - AAGTATTC -3'
2371s	5' - AGGTATAC -3'
2372s	5' - AGGTATCC -3'
2373s	5' - AGGTATTC -3'
3171s	5' - ATATATAC -3'
3172s	5' - ATATATCC -3'
3271s	5' - ATCTATAC -3'
3272s	5' - ATCTATCC -3'
3371s	5' - ATTTATAC -3'
3372s	5' - ATTTATCC -3'
3373s	5' - ATTTATTC -3'
4171s	5' - ATGCATAC -3'
4172s	5' - ATGCATCC -3'
4271s	5' - ATGAATAC -3'
4272s	5' - ATGAATCC -3'
4371s	5' - ATGGATAC -3'
4372s	5' - ATGGATCC -3'
4373s	5' - ATGGATTC -3'
5171s	5' - ATGTGTAC -3'

5172s 5' - ATGTGTCC -3'
5173s 5' - ATGTGTTC -3'

FIG. 5

2塩基置換 (アンチセンス)

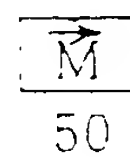
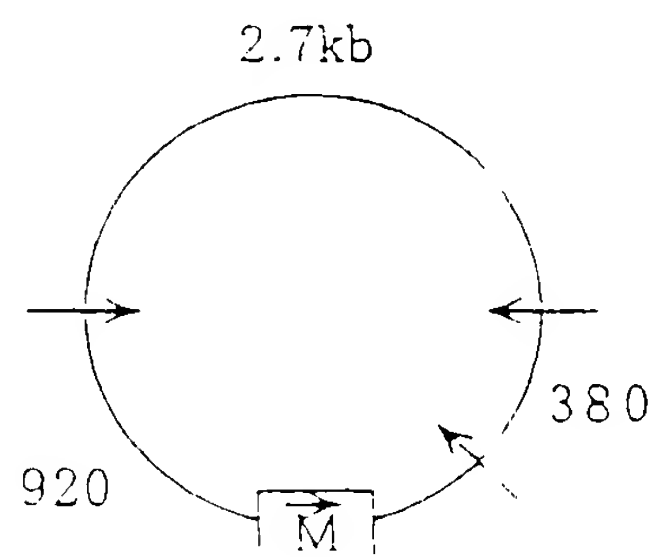
	37654321
wilda	5' - GCATACAT -3'
2171a	5' - GTATACGT -3'
2172a	5' - GGATACGT -3'
2173a	5' - GAATACGT -3'
2271a	5' - GTATACTT -3'
2272a	5' - GGATACTT -3'
2273a	5' - GAATACTT -3'
2371a	5' - GTATACCT -3'
2372a	5' - GGATACCT -3'
2373a	5' - GAATACCT -3'
3171a	5' - GTATATAT -3'
3172a	5' - GGATATAT -3'
3271a	5' - GTATAGAT -3'
3272a	5' - GGATAGAT -3'
3371a	5' - GTATAAAT -3'
3372a	5' - GGATAAAT -3'
3373a	5' - GAATAAAT -3'
4171a	5' - GTATGCAT -3'
4172a	5' - GGATGCAT -3'
4271a	5' - GTATT CAT -3'
4272a	5' - GGATT CAT -3'
4371a	5' - GTATCCAT -3'
4372a	5' - GGATCCAT -3'
4373a	5' - GAATCCAT -3'
5171a	5' - GTACACAT -3'
5172a	5' - GGACACAT -3'

5173a 5' - GAACACAT -3'
5174a 5' - GACTACAT -3'

FIG. 6



矢印はBsaHIサイト



5/16

FIG. 7

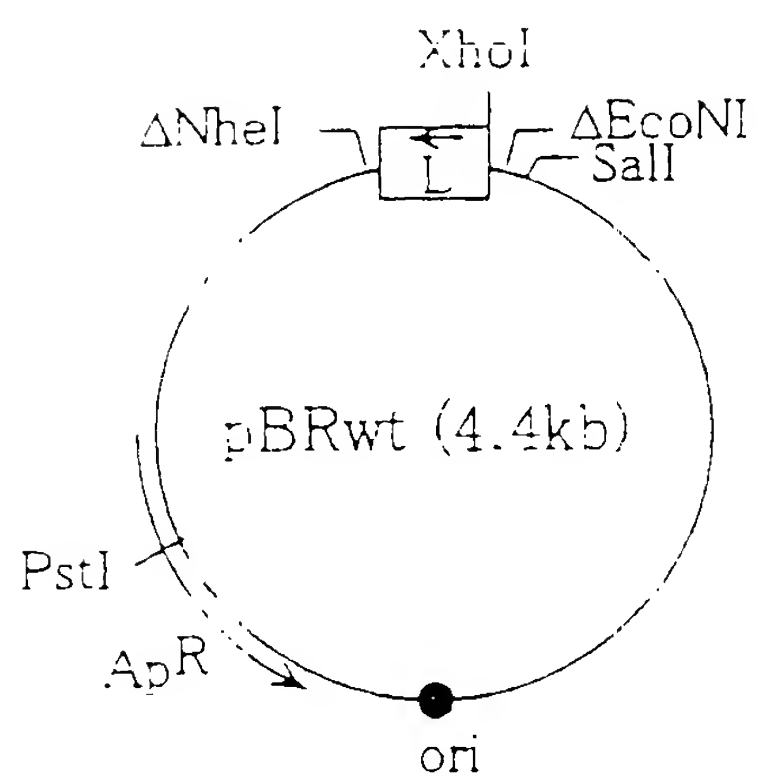
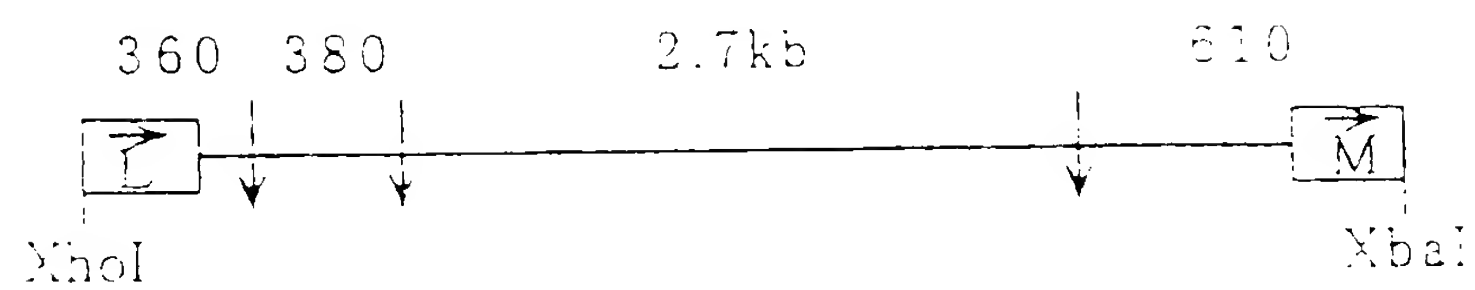


FIG. 8



6 / 16

FIG. 9

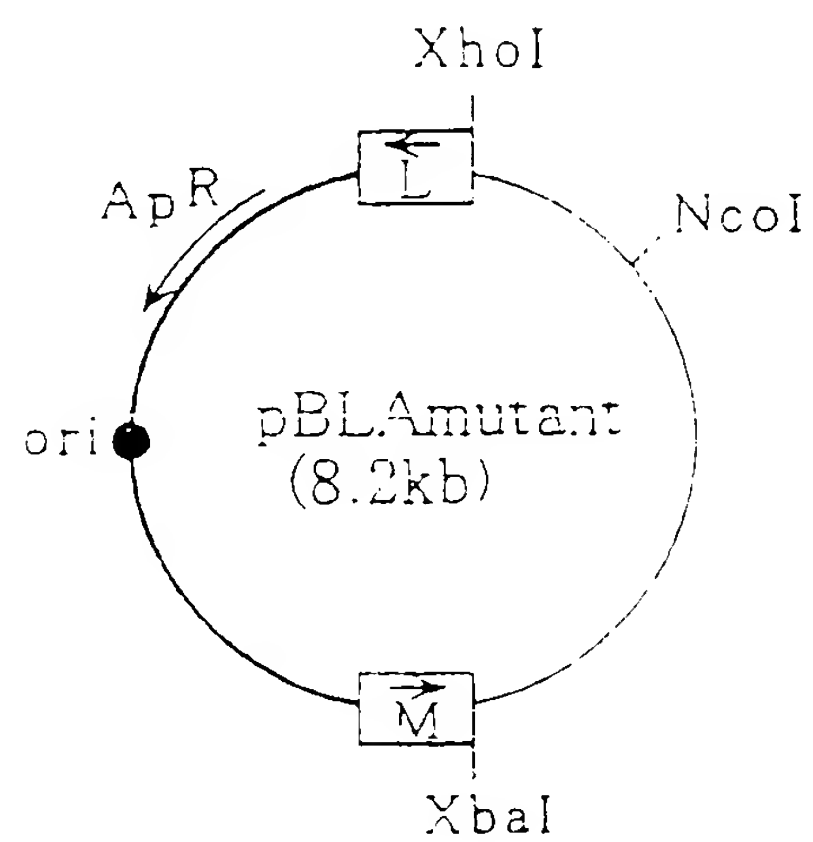


FIG. 10

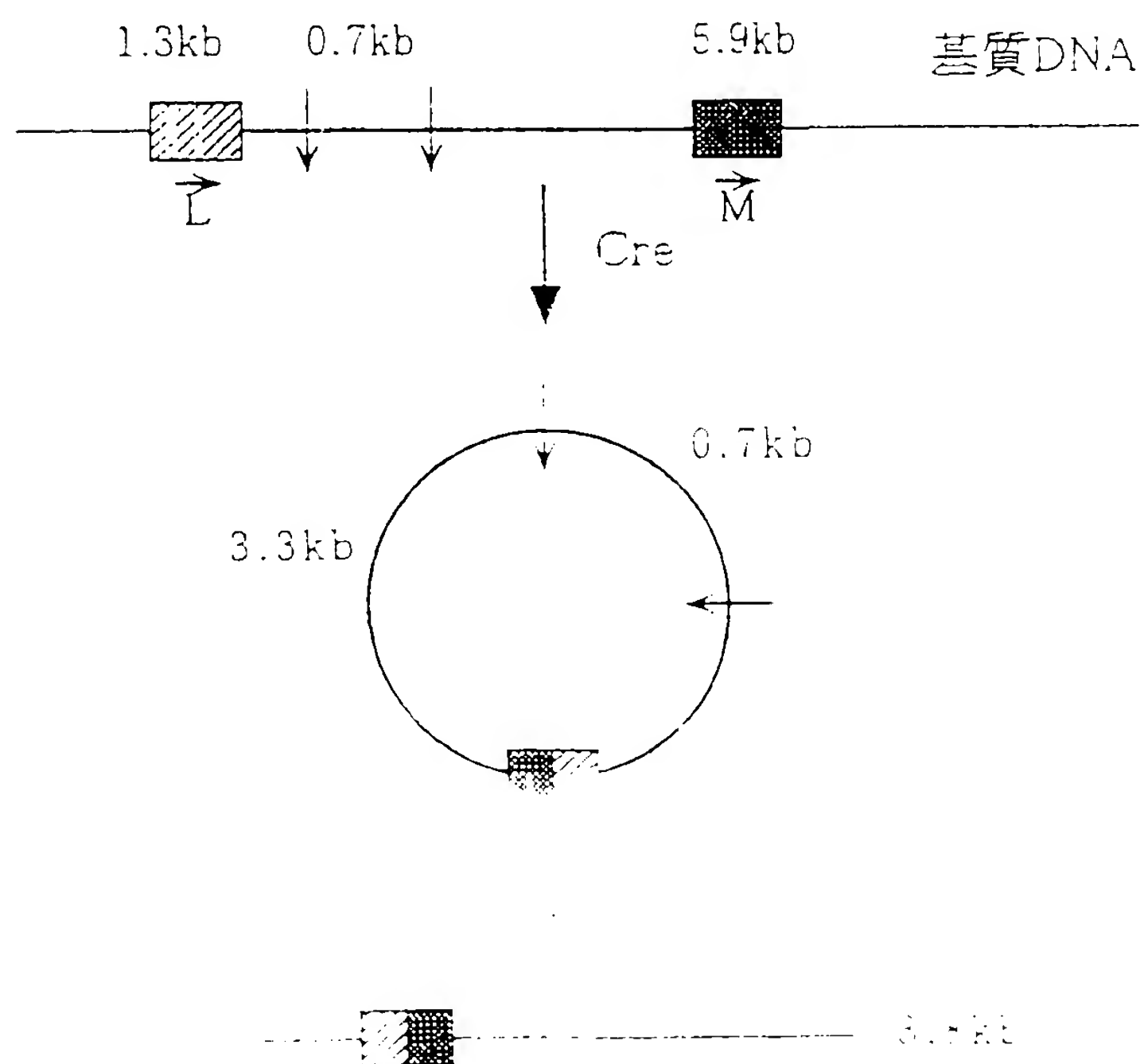


FIG. 11

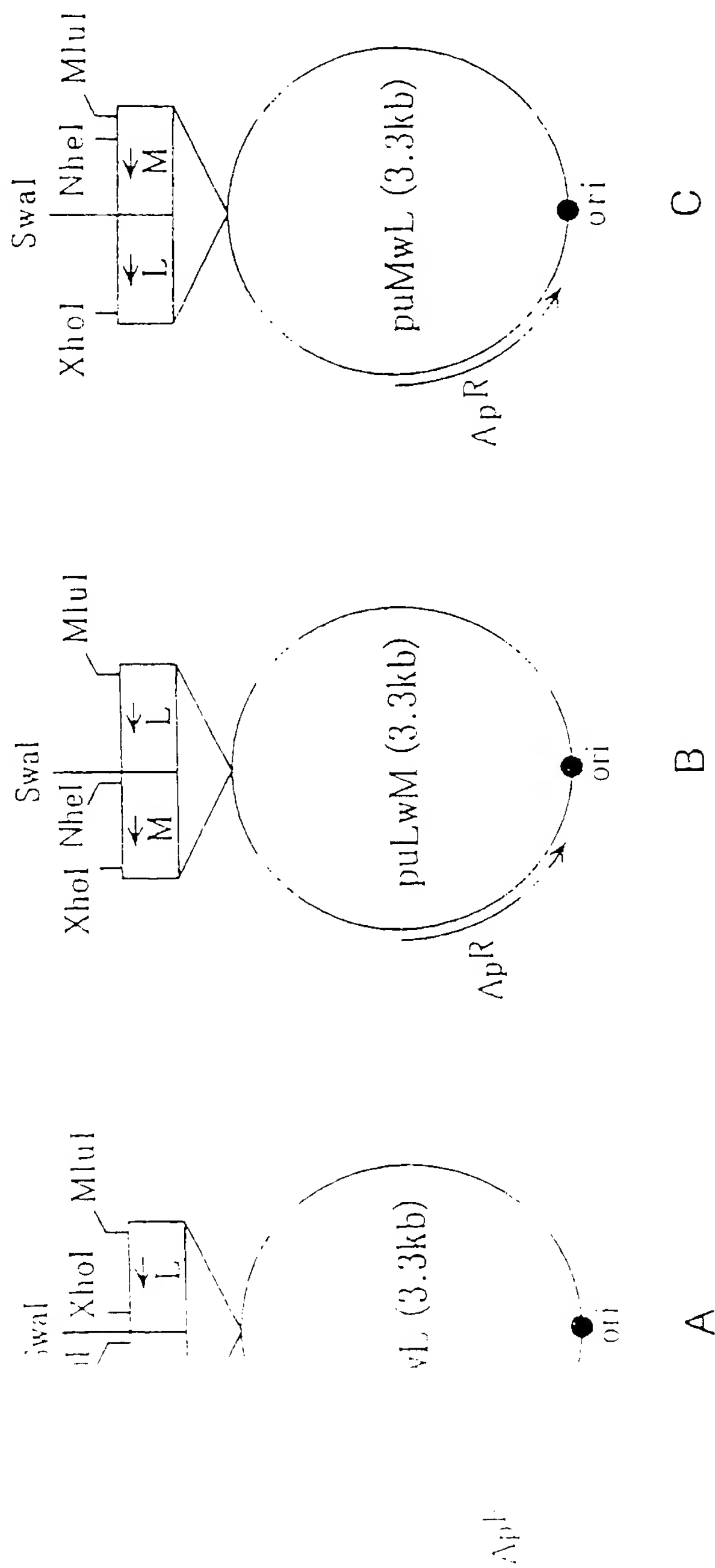


FIG. 12

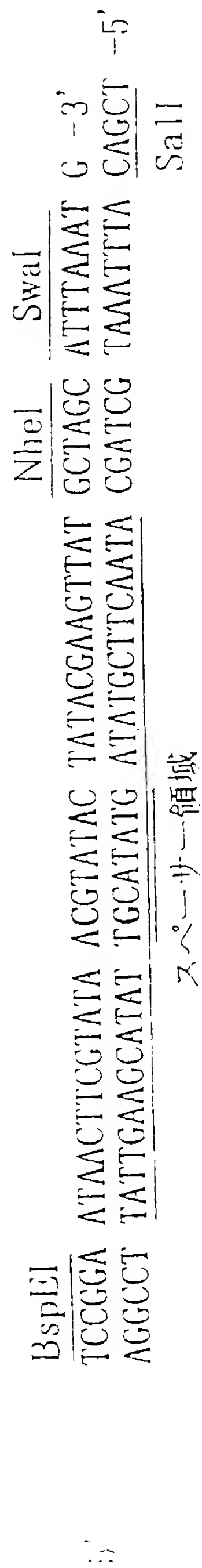
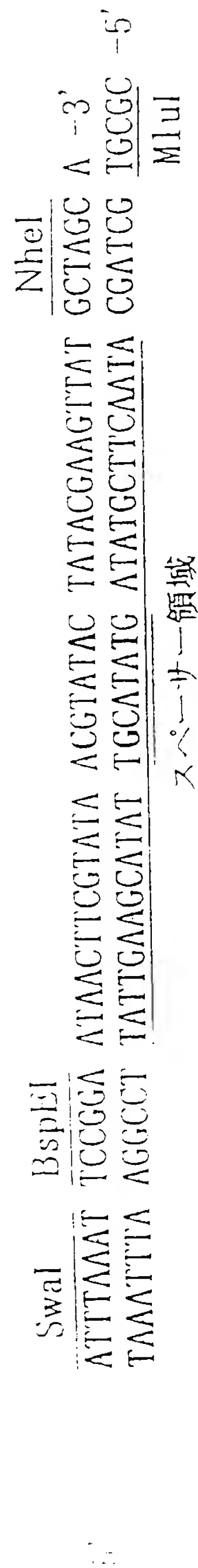
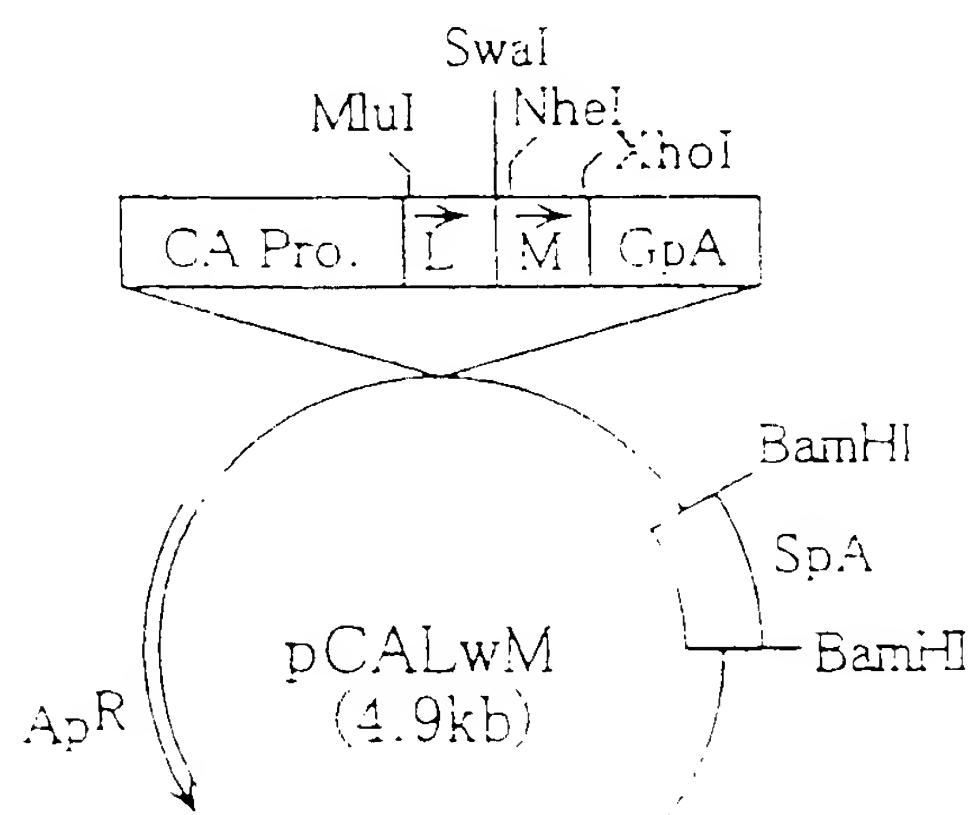
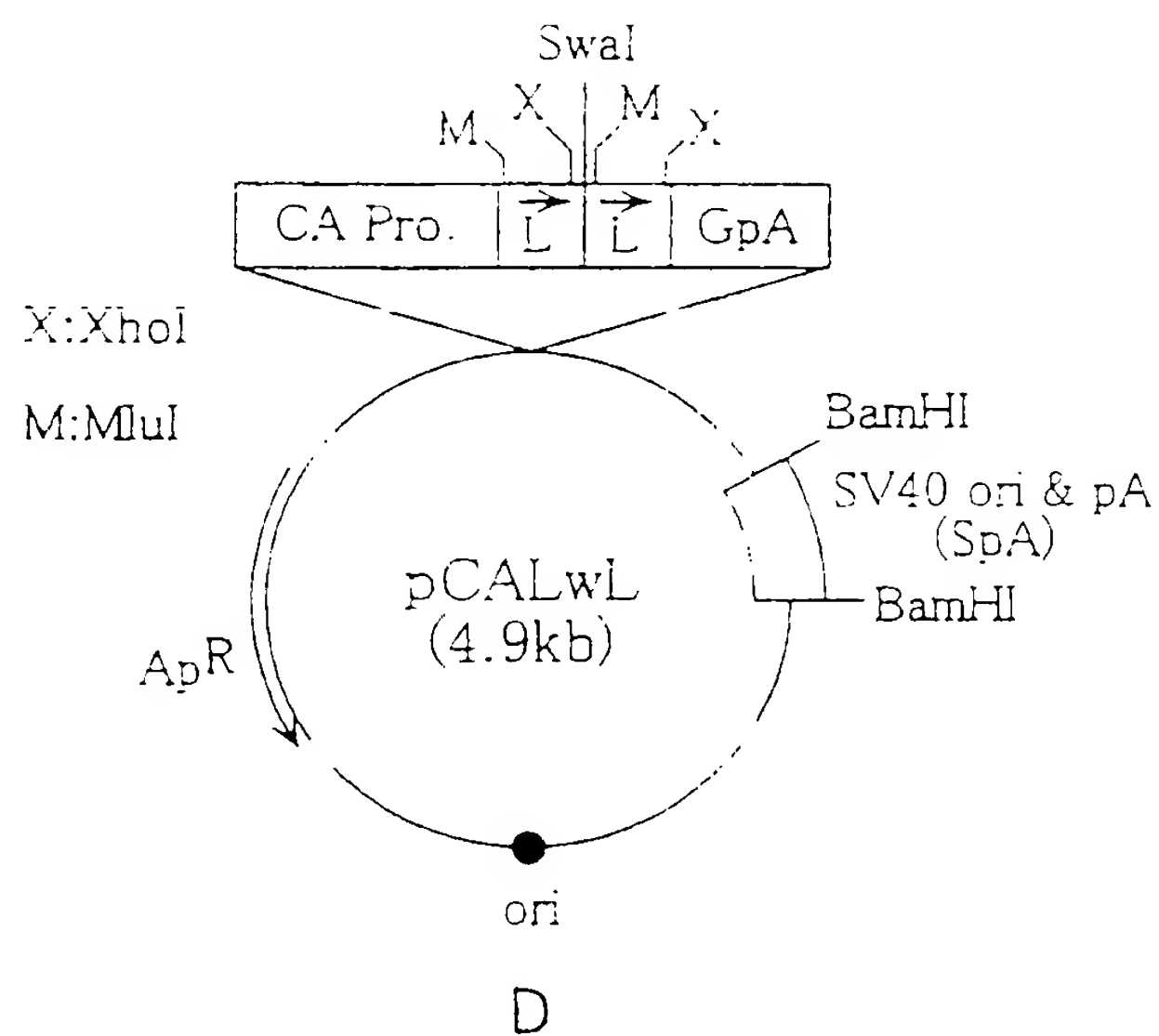


FIG. 13



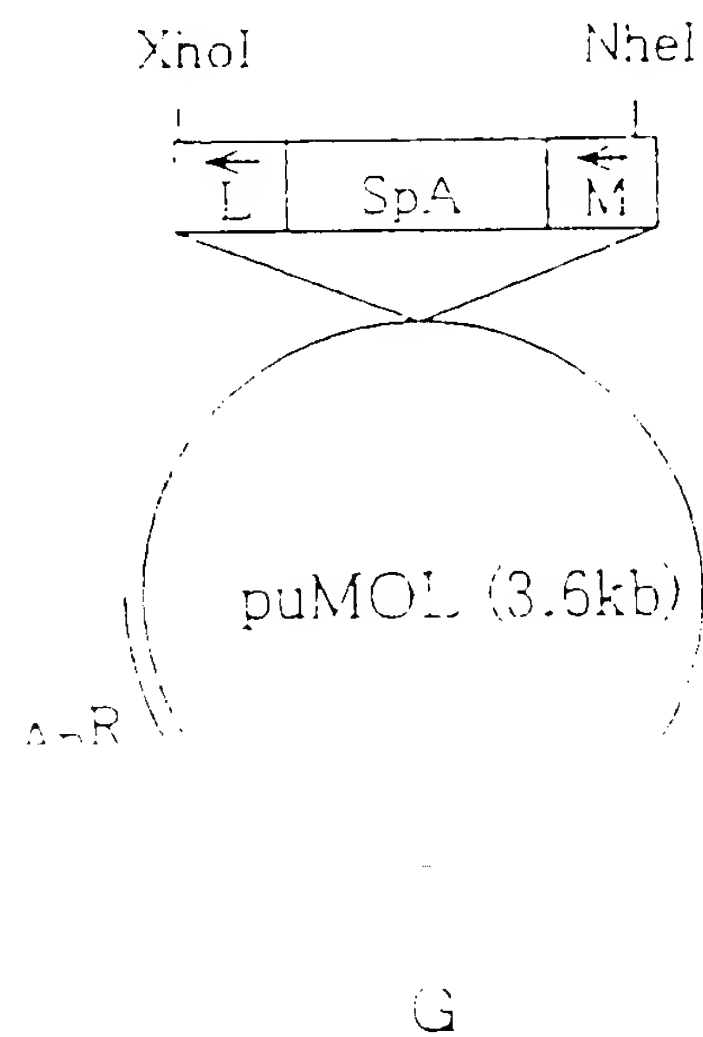
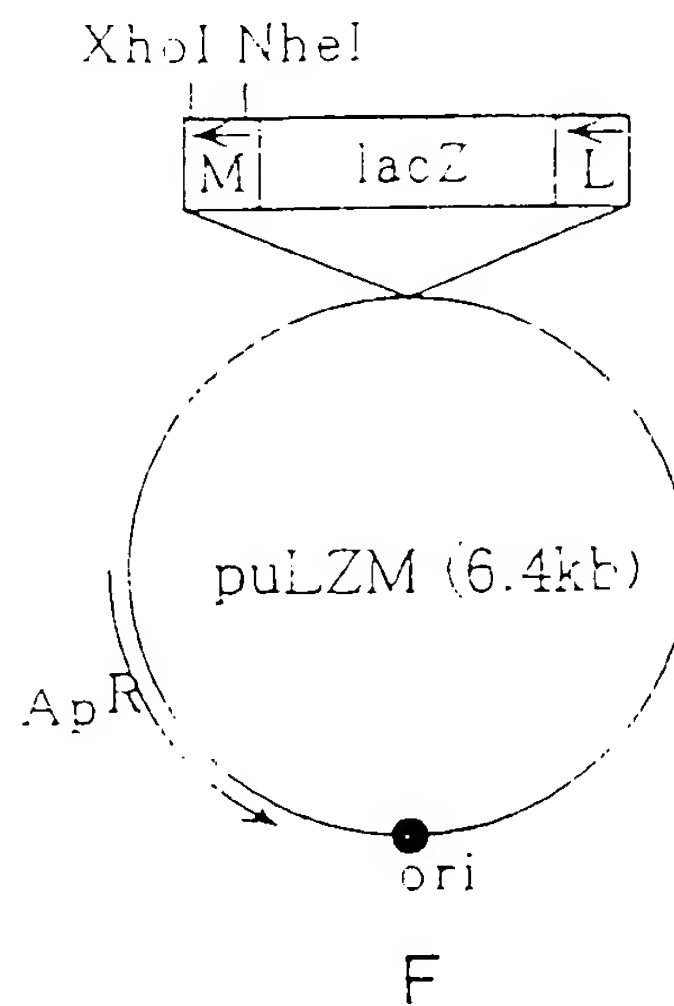
9/10

FIG. 14



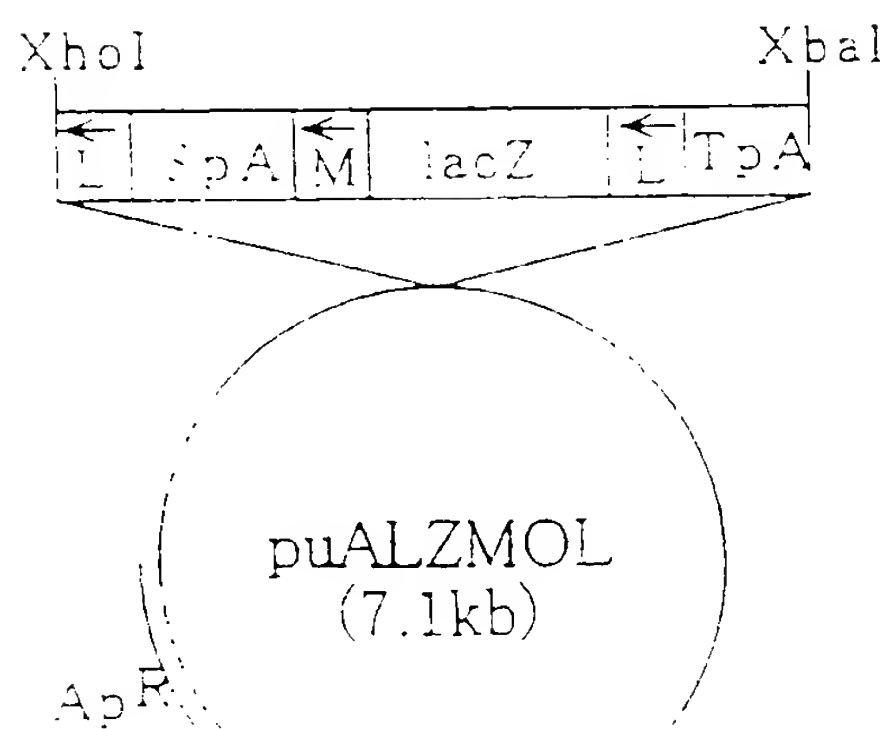
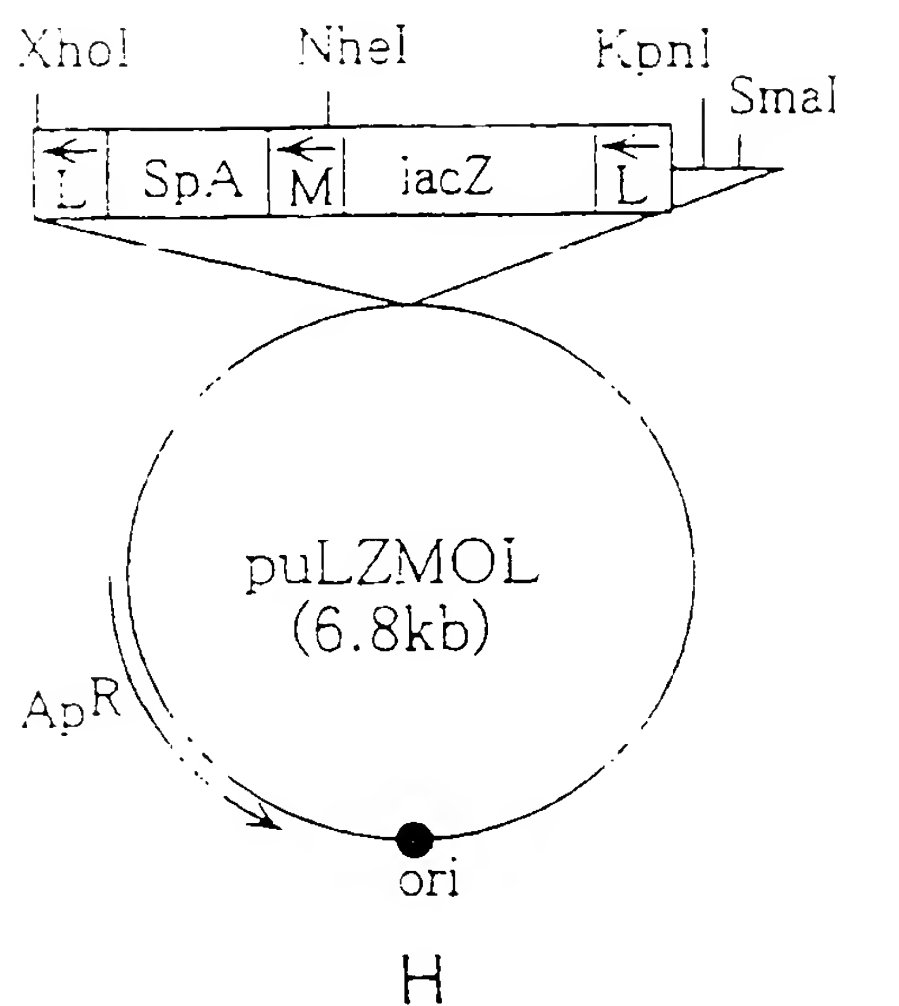
10/16

FIG. 15



11/16

FIG. 16



12/16

FIG. 17

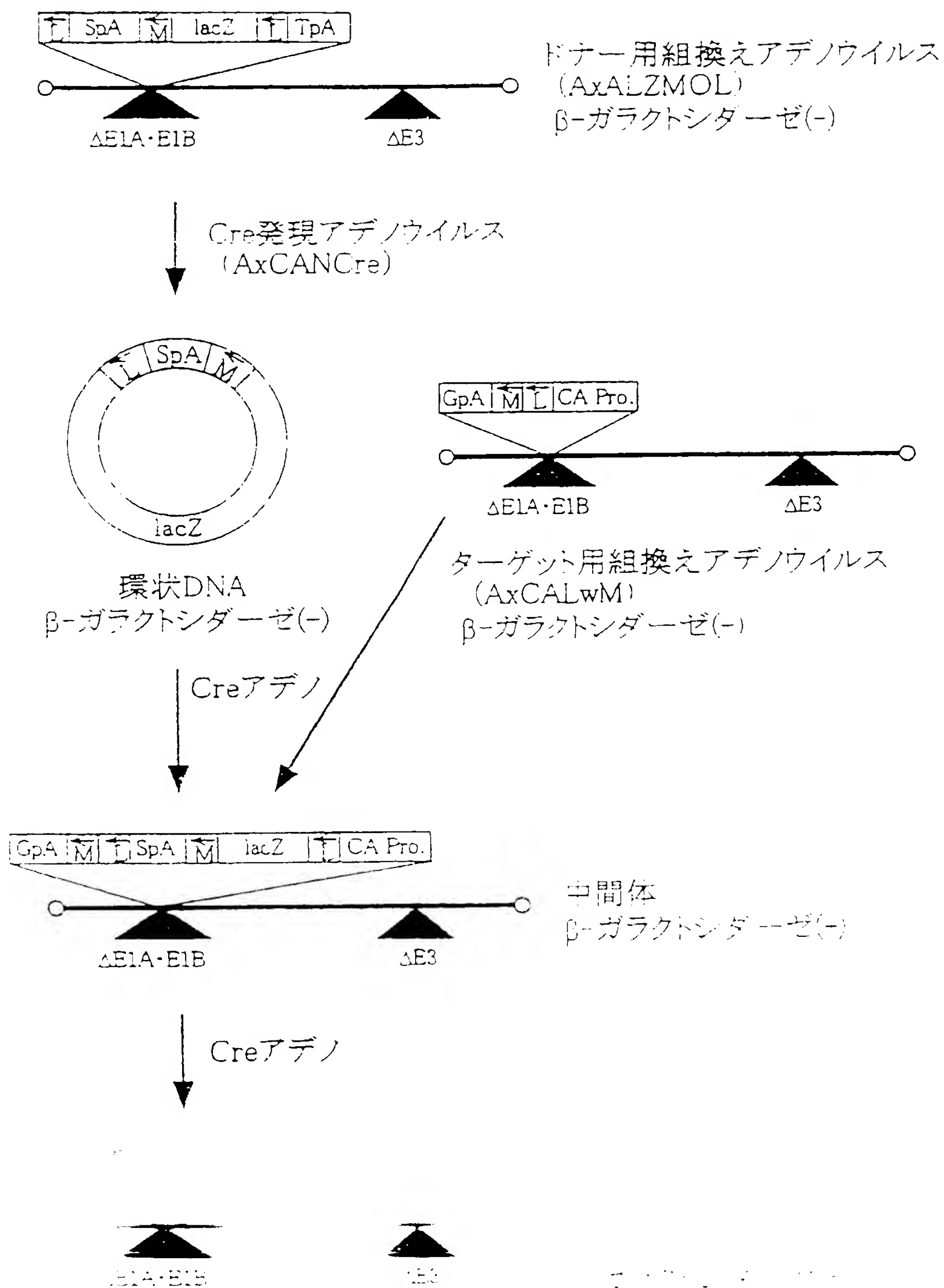
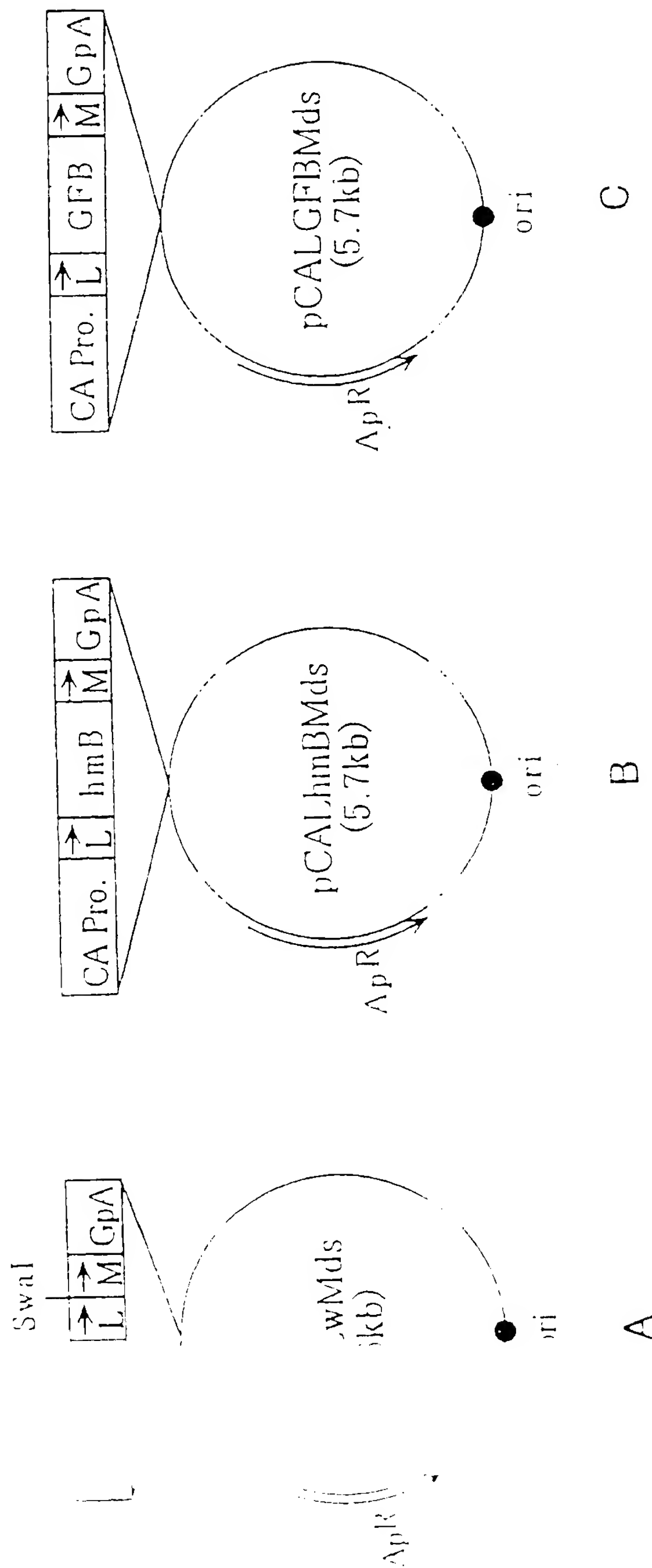
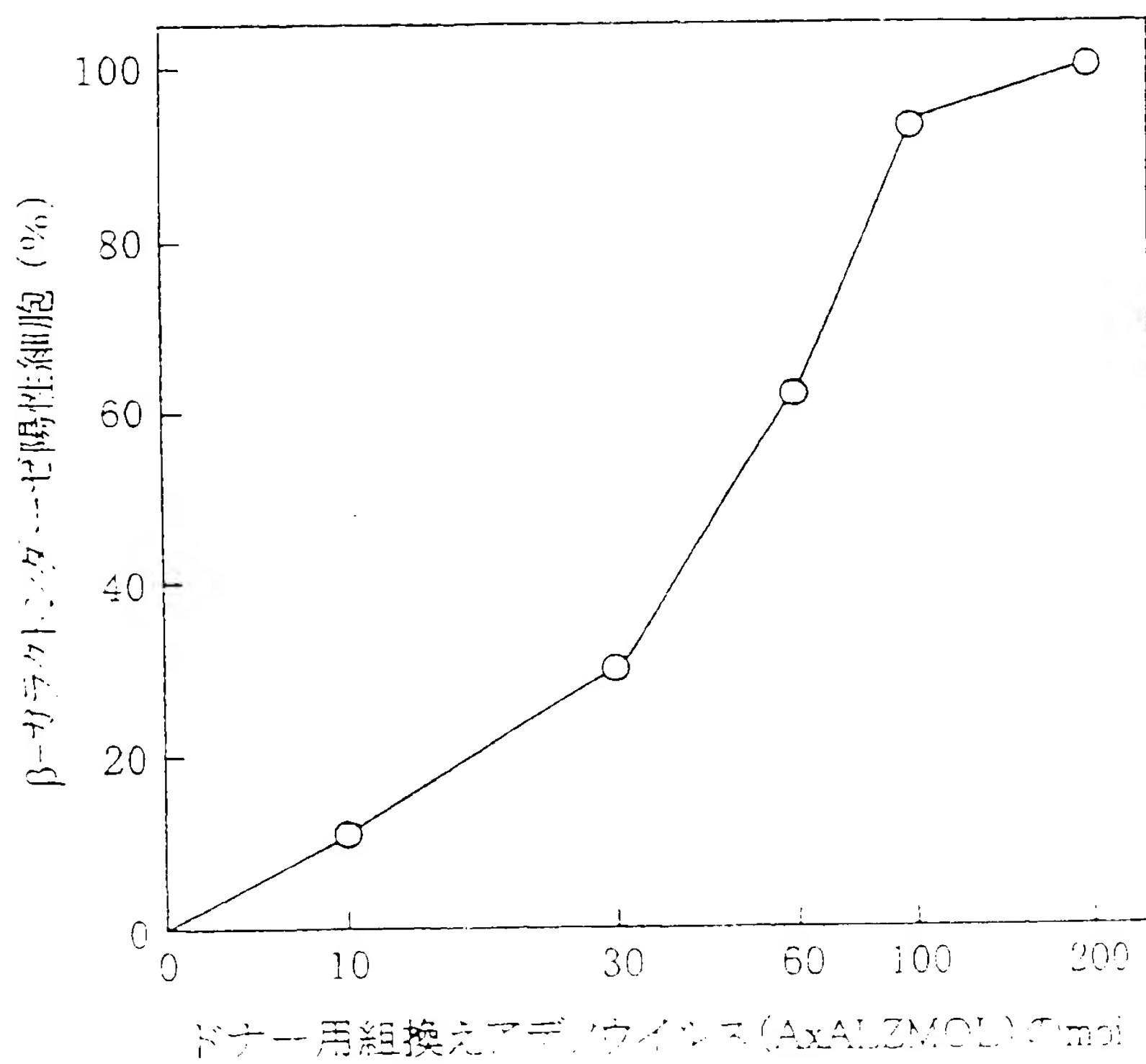


FIG. 18



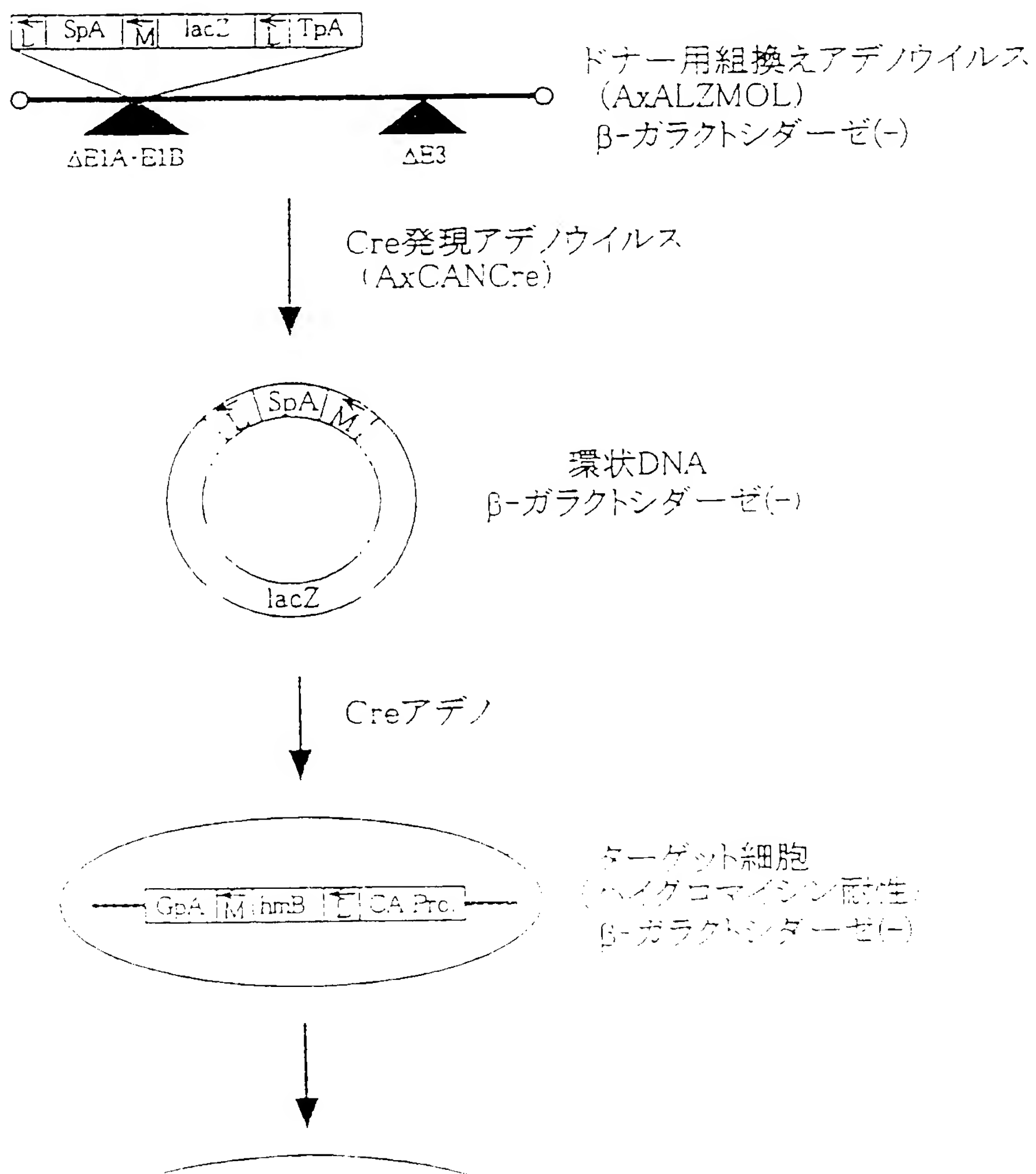
14/16

FIG. 19



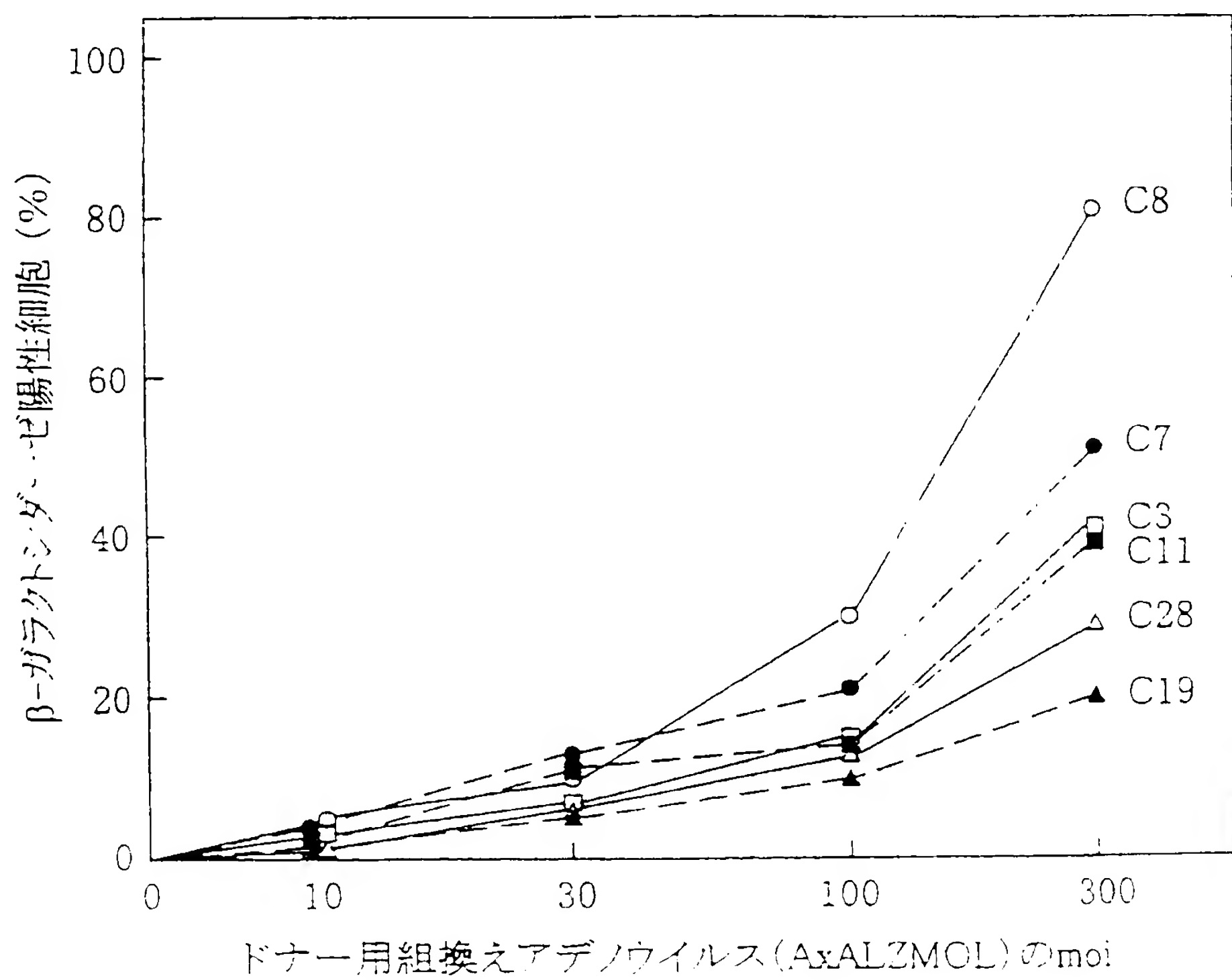
15/16

FIG. 20



16 / 16

FIG. 21



配列表

SEQUENCE LISTING

< 1 1 0 > Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited

5 < 1 2 0 > Mutated Type of loxP and Application thereof

< 1 3 0 > E 4 3 1 7 - 0 0

$$<150> \text{ J P } 9-331289 \quad \text{and} \quad \text{J P } 10-273150$$

10 < 151 > 1997-11-13 and 1998-9-28

 $\langle 160 \rangle 61$ $\langle 210 \rangle 1$

15 $\langle 2 \ 1 \ 1 \rangle \ 3 \ 4$

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Bacteriophage P1

 $\langle 400 \rangle 1$

20 ataacttctg ataatgtatg ctatagcaag ttat

 $\langle 2 \ 1 \ 0 \rangle 2$ $\langle 2 \ 1 \ 1 \rangle \ 3 \ 4$

< 2 1 2 > DNA

25 $\rightarrow 2 \ 1 \ 3 \ 5$ Artificial Sequence

— *Journal of the American Medical Association*, 1967, 201: 1001-1002.

< 4 0 0 > 2

ataacttcgt atagtgtatg ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 3

5 < 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

10 < 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 3

ataacttcgt atattgtatg ctatacgaag ttat

34

15 < 2 1 0 > 4

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

20 < 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 4

ataacttcgt atactgtatg ctatacgaag ttat

34

95

2 1 2 DNA

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

5 < 4 0 0 > 5

ataacttctg ataacgtatg ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 3 4

10 < 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

15

< 4 0 0 > 6

ataacttctg ataaagtatg ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 7

20 < 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

25 < 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

Sequence of Mutant loxP

< 2 1 0 > 8

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

5

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 1 0 0 > 8

10 ataacttcgt ataatatatg ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 9

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

15 < 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

20 < 1 0 0 > 9

ataacttcgt ataatttatg ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 1 0

< 2 1 1 > 3 4

25 < 2 1 2 > DNA

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 1 0

ataacttcgt ataatttatg ctatacgaag ttat

34

5 < 2 1 0 > 1 1

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

10 < 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 1 1

ataacttcgt ataatgcatg ctatacgaag ttat

34

15

< 2 1 0 > 1 2

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

20

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 1 2

25 ataacttcgt ataatgaatg ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 1 1

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

5

< 4 0 0 > 1 3

ataacttcgt ataatggatg ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 1 4

10 < 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

15 < 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 1 4

ataacttcgt ataatgtgtg ctatacgaag ttat

34

20 < 2 1 0 > 1 5

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

25 < 2 2 0 >

< 2 2 3 >

ataacttcgt ataatgtgtg ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 1 6

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

5 < 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

10 < 4 0 0 > 1 6

ataacttcgt ataatgtctg ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 1 7

< 2 1 1 > 3 4

15 < 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

20

< 4 0 0 > 1 7

ataacttcgt ataatgtacg ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 1 8

25 < 2 1 1 > 3 4

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 1 8

ataacttcgt ataatgtaag ctatacgaag ttat

34

5

< 2 1 0 > 1 9

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

10

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 1 9

15 ataacttcgt ataatgtagg ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 2 0

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

20 < 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

25 < 4 0 0 > 2 0

< 2 1 0 > 2 1

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

5 < 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 2 1

ataacttcgt ataatgtatc ctatacgaag ttat

34

10 < 2 1 0 > 2 2

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

15 < 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 2 2

ataacttcgt ataatgtatt ctatacgaag ttat

34

20

< 2 1 0 > 2 3

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

25

< 4 0 0 > 2 3

ataacttcgt ataatgtatg ttatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 2 4

< 2 1 1 > 3 4

5 < 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

10

< 4 0 0 > 2 4

ataacttcgt ataatgtatg gtatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 2 5

15 < 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

20 < 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 2 5

ataacttcgt ataatgtatg atatacgaag ttat

34

25 < 2 1 0 > 2 6

< 2 1 1 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 2 6

5 ataacttcgt ataacgtata ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 2 7

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

10 < 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

15 < 4 0 0 > 2 7

ataacttcgt ataacgtata ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 2 8

< 2 1 1 > 3 4

20 < 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

25

< 2 1 0 > 2 9

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

5 < 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 2 9

ataacttcgt ataaagtata ctatacgaag ttat

34

10

< 2 1 0 > 3 0

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

15

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 3 0

20 ataacttcgt ataaagtata ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 3 1

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

25 < 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 3 1

ataacttcgt ataaagtatt ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 3 2

5 < 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

10 < 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 3 2

ataacttcgt ataaggtata ctatacgaag ttat

34

15 < 2 1 0 > 3 3

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

20 < 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 3 3

ataacttcgt ataaggtata ctatacgaag ttat

34

25

< 2 1 2 > DNA

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

5 < 4 0 0 > 3 4

ataacttcgt ataaggtatt ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 3 5

< 2 1 1 > 3 4

10 < 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

15

< 4 0 0 > 3 5

ataacttcgt ataatatata ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 3 6

20 < 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

25 < 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

FIG. 10. Sequence of the mutant loxP site.

< 2 1 0 > 3 7

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

5

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 3 7

10 ataacttcgt ataactctata ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 3 8

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

15 < 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

20 < 4 0 0 > 3 8

ataacttcgt ataactctata ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 3 9

< 2 1 1 > 3 4

25 < 2 1 2 > DNA

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 3 9

ataacttcgt ataatttata ctatacgaag ttat

34

5 < 2 1 0 > 4 0

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

10 < 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 4 0

ataacttcgt ataatttate ctatacgaag ttat

34

15

< 2 1 0 > 4 1

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

20

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 4 1

25 ataacttcgt ataatttatt ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 4 1

< 2 1 2 > DNA

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

$\langle 400 \rangle 42$

34

 $\langle 2 \ 1 \ 0 \rangle \ 4 \ 3$

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

15 < 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

 $\angle 400 \rightarrow 43$

34

20 2 1 0 2 4 4

$$2 \ 1 \ 1 \rightarrow 3 \ 4$$

$\langle 2\ 1\ 2 \rangle$ DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

25 < 2 2 0 >

< 2 1 0 > 4 5

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

5 < 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

10 < 4 0 0 > 4 5

ataacttcgt ataatagaac ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 4 6

< 2 1 1 > 3 4

15 < 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

20

< 4 0 0 > 4 6

ataacttcgt ataatagata ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 4 7

25 < 2 1 1 > 3 4

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 4 7

ataacttcgt ataatggatc ctatacgaag ttat

34

5

< 2 1 0 > 4 8

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

10

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 4 8

15 ataacttcgt ataatggatt ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 4 9

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

20 < 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

25 < 4 0 0 > 4 9

< 2 1 0 > 4 9

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

5 < 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 5 0

ataacttcgt ataatgtttc ctatacgaag ttat

34

10 < 2 1 0 > 5 1

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

15 < 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 5 1

ataacttcgt ataatgtctt ctatacgaag ttat

34

20

< 2 1 0 > 5 2

< 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

25

< 4 0 0 > 5 2

ataacttcgt ataatgtaca ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 5 3

< 2 1 1 > 3 4

5 < 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

10

< 4 0 0 > 5 3

ataacttcgt ataatgtaac ctatacgaag ttat

34

< 2 1 0 > 5 4

15 < 2 1 1 > 3 4

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

20 < 2 2 3 > Sequence of Mutant loxP

< 4 0 0 > 5 4

ataacttcgt ataatgtagt ctatacgaag ttat

34

25 < 2 1 0 > 5 5

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sense Strand of Designed Sequence Containing Sequence of
Wild-type loxP and Restriction Enzyme Recognition Site

5 < 4 0 0 > 5 5

tcgaggtgca cataacttcg tataatgtat gctatacgaa gttatacgcg tt 52

< 2 1 0 > 5 6

< 2 1 1 > 5 2

10 < 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Antisense Strand of Designed Sequence Containing Sequence of
15 Wild-type loxP and Restriction Enzyme Recognition Site

< 4 0 0 > 5 6

ctagaacgcg tataacttcg tatagcatac attatacgaa gttatgtgca cc 52

20 < 2 1 0 > 5 7

< 2 1 1 > 6 0

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

25 < 2 2 0 >

tcgagtcgg aataactcg tataacgtat actatacgaa gttatgctag catttaaag 60

< 2 1 0 > 5 8

< 2 1 1 > 6 0

5 < 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Antisense Strand of Designed Sequence Containing Sequence of
10 Mutant loxP and Restriction Enzyme Recognition Site

< 4 0 0 > 5 8

tcgacattta aatgctagca taacttcgta tagtatacgt tatacgaagt tattccggac 60

15 < 2 1 0 > 5 9

< 2 1 1 > 6 0

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

20 < 2 2 0 >

< 2 2 3 > Sense Strand of Designed Sequence Containing Sequence of
Mutant loxP and Restriction Enzyme Recognition Site

< 4 0 0 > 5 9

25 ccgcattta aattccggaa taacttcgta taacgtatac tatacgaagt tatgctagca 60

< 2 1 1 > 6 0

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > Antisense Strand of Designed Sequence Containing Sequence of

5 Mutant loxP and Restriction Enzyme Recognition Site

< 4 0 0 > 6 0

cgcgtgctag cataacttcg tatagtatac gttatacgaa gttattccgg aatttaaag 60

10 < 2 1 0 > 6 1

< 2 1 1 > 1 0

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

15 < 2 2 0 >

< 2 2 3 > SwaI liner

< 4 0 0 > 6 1

gatttaaagc

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05094

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ C12N15/66, C12N15/79, C12N5/06, A61K48/00, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ C12N15/66, C12N15/79, C12N5/06, A61K48/00, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Gwang Lee et al., "Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination", Gene (1998) Vol. 216, No. 1 p.55-65	1-21
A	Y. Sakai et al., "Highly enhanced and specific expression for hepatocellular carcinoma in vivo using recombinant adenovirus vector with cre/loxP system", Hepatology (1997) Vol. 26, No. 4, Pt. 2 p.171A	1-21
A	Ronald H. Hoess et al., "The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination", Nucleic Acids Research (1986) Vol. 14, No. 5, p.2287-2300	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Name and mailing address of the ISA

Japanese Patent Office

Name and mailing address of the ISA

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/66, C12N 15/79, C12N 5/06, A61K 48/00,
A01K 67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/66, C12N 15/79, C12N 5/06, A61K 48/00,
A01K 67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P,X	Gwang Lee et al. "Role of nucleotide sequences of <i>loxP</i> spacer region in Cre-mediated recombination", Gene (1998) Vol. 216, No. 1 p. 55-65	1-21
A	Y. Sakai et al. "Highly enhanced and specific expression for hepatocellular carcinoma in vivo using recombinant adenovirus vector with cre/loxP system", Hepatology (1997) Vol. 26, No. 4, Pt. 2 p. 171A	1-21
A	Ronald H. Hoess et al. "The role of the <i>loxP</i> spacer region in P1 site-specific recombination", Nucleic Acids Research (1986) Vol. 14, No. 5, p. 2287-2300	1-21

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

A. 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

E. 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

L. 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

O. 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

P. 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

T. 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

X. 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

Y. 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

☆. 同一パテントファミリー文献